



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

*“Evaluación del rol de la vía canónica de Wnt
en la adicción a cocaína”*

Presentada por: Lic. Santiago Cuesta.

Rosario, Argentina.
2015

“Evaluación del rol de la vía canónica de Wnt en la adicción a cocaína”

Santiago Cuesta

Licenciado en Biotecnología.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Toxicología Experimental, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el mes de abril de 2011 y el mes de abril del 2015, bajo la dirección de la Dra. Alejandra M. Pacchioni.

Parte de los resultados obtenidos en la presente Tesis forman parte de los siguientes manuscritos:

- **Cuesta S.**, M. J. Severin, S. B. Rosso, and A. M. Pacchioni. (2015) "A new role of PFC's Wnt/ β catenin pathway in cocaine induced-neuroadaptations". Enviado a *Addiction Biology*. Manuscript ID: AB-03-2015-0087. *En revisión*.
- **Cuesta S.**, J. Batuecas, S. B. Rosso, and A. M. Pacchioni. (2015) "Role of Wnt canonical pathway in the expression of cocaine induced-sensitization". *Manuscrito en preparación*.

Y fueron presentados en los siguientes congresos:

- "Involvement of Wnt/ β catenin pathway in cocaine induced sensitization". **S. Cuesta**, S. B. Rosso, A. M. Pacchioni. 44th Society for Neuroscience annual meeting. 2014. Washington, DC, EEUU.
- "Cocaine induced sensitization is associated with decrease activity of the Wnt/ β catenin pathway in Dorsal Striatum". **S. Cuesta**, A. Funes, S. B. Rosso, A. M. Pacchioni. XXIX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 2014. Huerta Grande, Córdoba.
- "Involvement of PFC's Wnt/ β catenin pathway in cocaine induced sensitization". **S. Cuesta**, M. J. Severin, J. Batuecas, S. B. Rosso, A. M. Pacchioni. XXVIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 2013. Huerta Grande, Córdoba. *Presentación Oral*.
- "Rol of the Wnt/ β catenin pathway in the development of cocaine induced sensitization". **S. Cuesta**, J. Batuecas, M. J. Severin, S. Rosso, A. M. Pacchioni. XXVIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 2013. Huerta Grande, Córdoba.
- "Role of Wnt/ β catenin signaling pathway in cocaine induced sensitization". **S. Cuesta**, M. J. Severin, J. Batuecas, S. B. Rosso, A. M. Pacchioni. 42nd Society for Neuroscience annual meeting. 2012. New Orleans, LO, EEUU.
- "Evaluación del posible rol neuroprotector de los factores de crecimiento Wnt frente a la adicción a psicoestimulantes". **S. Cuesta**, S. Rosso, A. M. Pacchioni. VI Jornadas de Divulgación sobre la Investigación Científica en la UNR, "Alfabetización Científico-Tecnológica". 2012. Rosario, Santa Fé.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigación de la UNR (CIUNR) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas otorgadas para la realización de esta Tesis.

A la Dra. Alejandra M. Pacchioni por permitirme formar parte de su grupo, por su paciencia, dedicación y por su predisposición en todo momento en que necesité su ayuda. Gracias por la confianza durante toda la realización de este proyecto.

A la Dra. Silvana Rosso, por su colaboración y calidez durante esta etapa de formación.

A todos los miembros de la Cátedra de Toxicología, por todos estos años compartidos.

A mis tutores de Tesis, los Dres. Nelson Sturtz y Bettina Bongiovanni, por sus sugerencias y aportes a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio. A Sil B, Jor, Maju, Aymi y Edi gracias por las enseñanzas, la ayuda, los consejos y por sobre todo, por la diversión del trabajo diario. Particularmente a Romi, por soportarme desde el principio y hasta el final, por tu humildad, generosidad, practicidad y sentido del humor.

A mis amigos, los de acá y los de allá, que me acompañan siempre.

A mi familia, por bancarme en todas mis decisiones. Nada hubiera sido posible sin la tranquilidad de saber que están ahí incondicionalmente.

A mi mamá por enseñarme a valorar los “grandes logros”, pero principalmente, por transmitirme esa capacidad de disfrutar de las pequeñas cosas cotidianas. Gracias por estar presente a cada momento.

A mi papá, por su ayuda y apoyo constante.

A mis hermanos: por ser mis mejores amigos.

A Flor, por los proyectos, por confiar en mí, quererme y acompañarme en todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	7
LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA	8
<i>Síntesis, liberación, regulación y degradación de la DA</i>	9
VÍAS DOPAMINÉRGICAS CENTRALES	13
<i>Vía Nigroestriatal</i>	13
<i>Vías Mesolímbica y Mesocortical</i>	13
<i>Vía Tuberoinfundibular</i>	14
CIRCUITOS DE LOS GRANGLIOS DE LA BASE	15
<i>Dopamina y motivación</i>	18
<i>Circuito de la motivación</i>	19
ADICCIÓN A PSICOESTIMULANTES	22
<i>Modelos comportamentales de adicción a cocaína</i>	24
<i>Sensibilización inducida por psicoestimulantes</i>	25
<i>Cambios plásticos estructurales asociados a la exposición a cocaína</i>	30
FACTORES WNT Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	31
<i>Vía canónica de Wnt o Wnt/βcatenina</i>	33
VÍA CANÓNICA, DESÓRDENES NEUROPSIQUIÁTRICOS Y ADICCIÓN ...	35
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	39
PROCEDIMIENTOS GENERALES	40
ESTUDIOS COMPORTAMENTALES	43
ESTUDIOS MOLECULARES	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	51
RESULTADOS	53
DESARROLLO DE SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA	54
EXPRESIÓN DE SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA	75
DISCUSIÓN	92
CONCLUSIÓN	104
REFERENCIAS	106

ABREVIATURAS

3-MT: 3-*O*-metildopamina

ABL: Amígdala basolateral

ADHD: Déficit de Atención e Hiperactividad

Akt: Proteín quinasa B

Amíg: Amígdala

AMPA: a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiónico

APC: Poliposis adenomatosa coli

ATV: Área Tegmental Ventral

CaMKII: Ca²⁺-calmodulina quinasa II

CK-1 α : Caseína quinasa 1 α

COMPT: Catecol-*O*-metiltransferasa

CPF: Corteza Prefrontal

CPF_d: Corteza Prefrontal dorsal

CPF_m: Corteza Prefrontal medial

CPF_v: Corteza Prefrontal ventral

D₁R: Receptores de dopamina de tipo 1

D₂R: Receptores de dopamina de tipo 2

DA: Dopamina

DAT: Transportador de dopamina

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacetico

Dvl: Dishevelled

ED: Estriado Dorsal

EV: Estriado Ventral

Fz: Frizzled

GABA: Ácido Gama Amino Butírico

GB: Ganglios Basales

Glu: Glutamato

GPe: Globo Pálido externo

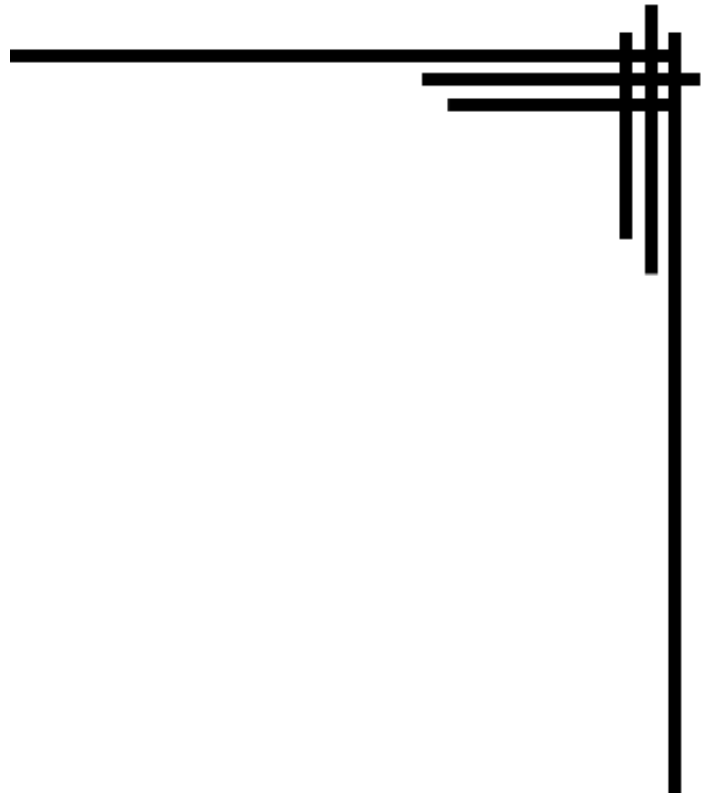
GPi: Globo Pálido interno

GSK3 β : Glucógeno quinasa sintasa 3 β

HVA: Ácido homovainilínico

L-DOPA: 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina

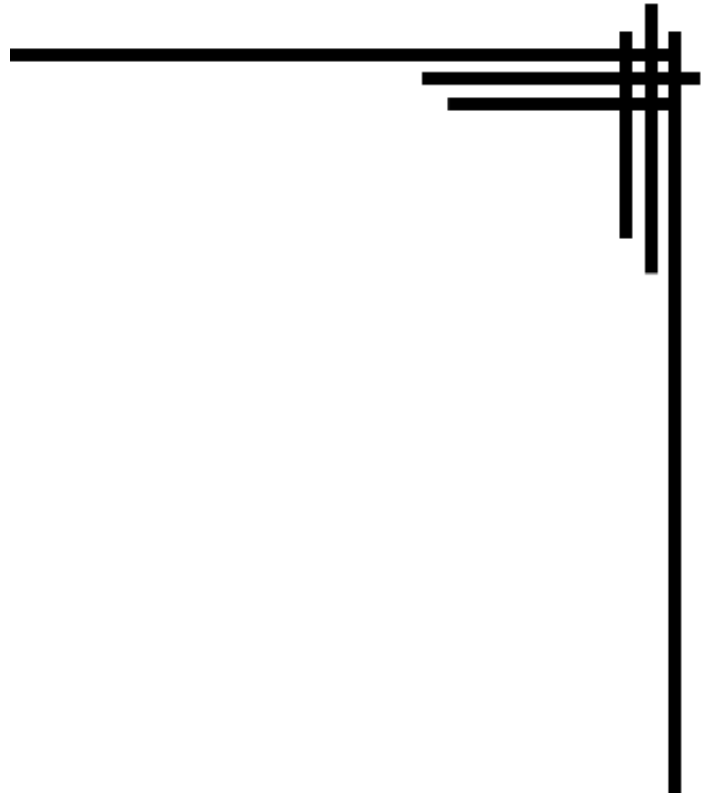
LEF: Factor aumentador linfoide
LRP_{5/6}: Correceptor asociado a la lipoproteína de baja densidad 5/6
MAO: Monoamina oxidasa
MD: Tálamo mediodorsal
mGluR_{2/3}: Receptores metabotrópicos de glutamato de tipo II
NA_c: Núcleo Accumbens core
NAcc: Núcleo Accumbens
NA_s: Núcleo Accumbens shell
NEM: Neurona espinosa mediana
NMDA: N-metil-D-aspartato
NST: Núcleos subtalámicos
PV: Pálido ventral
PV_l: Pálido ventral lateral
PV_m: Pálido ventral medial
SN: Sustancia Nigra
SNC: Sistema Nervioso Central
SNc: Sustancia Nigra Compacta
SNr: Sustancia Nigra Reticulada
TCF: Factor de células T
VMAT2: Transportador vesicular de monoaminas de alta afinidad
Wnt: Del inglés, Wingless-related integration site
xCT: Intercambiador cistina/glutamato



RESUMEN

La adicción es una enfermedad que se caracteriza por el uso y la búsqueda compulsiva de la droga a pesar de las consecuencias adversas que produce su consumo. Las drogas de abuso actúan sobre la vía dopaminérgica mesocorticolímbica [1, 2]. El consumo crónico de drogas produce la estimulación repetida de este circuito dando lugar a una serie de neuroadaptaciones a largo plazo, que se reflejan en dos características importantes de la adicción: la incapacidad para controlar el deseo de obtener y usar drogas, y los altos niveles de reincidencia aun luego de largos períodos de abstinencia [3, 4]. Entre las drogas de mayor consumo a nivel mundial se encuentra la cocaína. Evidencias obtenidas utilizando modelos animales para estudiar la adicción a drogas, indican que la cocaína produce una serie de modificaciones moleculares, y cambios plásticos, que serían similares a aquellos que se observan durante el desarrollo del sistema nervioso [5] y por lo tanto podrían involucrar, entre otras, a las vías de señalización de Wnt. Los factores Wnt pertenecen a una gran familia de proteínas de secreción que pueden activar tres cascadas de señalización: la vía canónica o Wnt/ β catenina, la vía de polaridad celular planar y la vía del Calcio [6]. Cada una de estas vías cumpliría un rol crítico durante el desarrollo embrionario regulando decisiones celulares y procesos homeostáticos. Sin embargo, poco se conoce hasta el momento sobre su rol en sistema nervioso adulto. En los últimos quince años, la deficiencia de la vía canónica ha sido relacionada con el desarrollo de neuropatologías en el cerebro adulto, tales como Alzheimer y esquizofrenia [7-10]. A pesar de que la adicción a cocaína, al igual que la esquizofrenia, afectan al sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, poco se sabía acerca del rol de las vías de señalización Wnt en la adicción a drogas. Por tal motivo, el objetivo general del presente proyecto de tesis fue examinar la participación de la vía de señalización canónica de Wnt, y sus efectores, en el desarrollo de neuroadaptaciones a largo plazo producidas por cocaína que serían responsables de la adicción a drogas. Utilizando la sensibilización comportamental como modelo para evaluar las modificaciones neurobiológicas que subyacen a la adicción [11], pudimos determinar, por primera vez, una relación directa entre la actividad de la vía de señalización Wnt/ β catenina en la Corteza Prefrontal y en el Núcleo Accumbens y las neuroadaptaciones necesarias para el desarrollo y la expresión de sensibilización comportamental, respectivamente. Además, los resultados obtenidos mostraron que la manipulación farmacológica de la actividad de la vía durante el

desarrollo de la sensibilización, tendría efectos a largo plazo frente a una nueva exposición a la cocaína. Teniendo en cuenta que la adicción continúa siendo un problema que afecta a la sociedad en su totalidad, y que aún no ha sido identificada una estrategia terapéutica efectiva, los hallazgos del presente trabajo de tesis resultan de gran importancia dado que proponen a la vía canónica de Wnt como un posible blanco de acción para el desarrollo de nuevas terapias.



INTRODUCCIÓN

LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA

La dopamina (DA) (3,4-dihidrofénilalanina) (Fig. 1), junto con noradrenalina, adrenalina, y serotonina son catecolaminas también referidas como aminas biogénicas o neurotransmisores monoaminérgicos. La DA es un importante neurotransmisor del Sistema Nervioso Central (SNC) en donde participa de una serie de regulaciones fisiológicas y, por lo tanto, también está involucrada en el desarrollo de enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas [12].

A pesar de haber sido identificada en el SNC a finales de 1950, de haberse visualizado las vías dopaminérgicas y establecido una relación entre la pérdida de DA y la enfermedad de Parkinson, aún a mediados de los 60' se debatía sobre su DA participación en la neurotransmisión. Fue en la década del 80' cuando su rol como neurotransmisor fue confirmado debido a la identificación de los distintos receptores específicos y al establecimiento de una relación entre la DA y distintos comportamientos como la actividad locomotora, los comportamientos estereotipados, el aprendizaje, la motivación, el consumo de comida y la recompensa [13]. Es así entonces que hoy es claro que la DA también tiene un rol principal en patologías relacionadas con el movimiento (como la enfermedad de Parkinson) o en desórdenes psiquiátricos tales como la esquizofrenia y el Déficit de Atención e Hiperactividad (ADHD). Más aún, la neurotransmisión dopaminérgica participa en los mecanismos asociados a las drogas de abuso que generan dependencia y también en la integración con de las respuestas del sistema de recompensa del cerebro [12].

Debido a la gran cantidad de funciones y a la importancia que tiene, la DA y sus sistemas siguen siendo blanco de numerosos estudios para permitir ampliar el conocimiento de sus efectos, funciones e interacciones y obtener diferentes beneficios y aplicaciones clínicas.

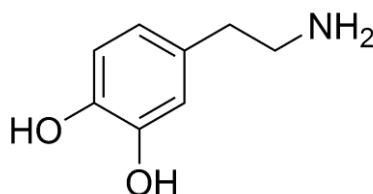


Figura 1: Estructura química de la Dopamina (3,4-dihidrofénilalanina)

Síntesis, liberación, regulación y degradación de la DA

Síntesis de la DA

Tanto la DA como las otras aminas biogénicas (noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina) son neurotransmisores clásicos, es decir, se sintetizan en las terminales axónicas presinápticas. Particularmente, la síntesis de DA involucra dos pasos enzimáticos que comienzan con el aminoácido Tirosina (Fig. 2). La tirosina es hidroxilada en la posición 3 por la enzima Tirosina Hidroxilasa para formar la 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina o L-DOPA. La Tirosina Hidroxilasa es la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de DA (y de otras catecolaminas) y por lo tanto es la que controla sus concentraciones neuronales. El paso siguiente de la biosíntesis se da cuando la Decarboxilasa de aminoácidos aromáticos transforma, rápidamente, la L-DOPA en DA [12].

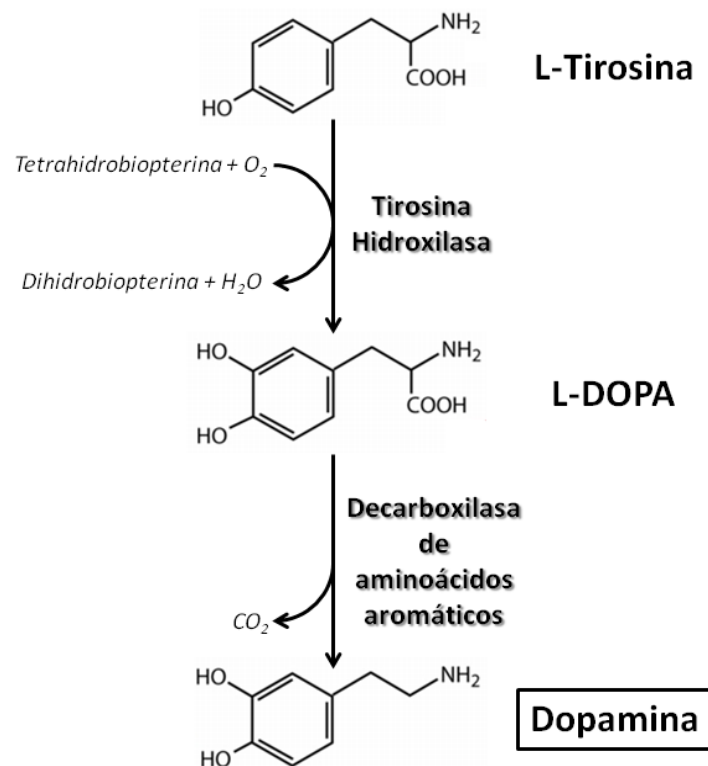


Figura 2: Biosíntesis de Dopamina

Liberación de DA

La DA sintetizada en las terminales nerviosas es luego almacenada en vesículas por un transportador vesicular de monoaminas de alta afinidad (VMAT2), que funciona

acoplado a un gradiente electroquímico generado por una bomba H^+ -ATPasa. Estas vesículas de almacenamiento se concentran en las terminales nerviosas y protegen, por un lado, a la célula de la toxicidad inherente de los neurotransmisores y, por el otro, a la DA de su metabolización en el citoplasma [14]. Cuando un potencial de acción alcanza la terminal nerviosa, la despolarización de la membrana activa canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje, permitiendo la acumulación intracelular de éste catión. El aumento de la concentración de Ca^{2+} afecta a diversas proteínas entre las que se encuentran aquellas involucradas en la exocitosis, permitiendo que las vesículas se fusionen con la membrana presináptica y consecuentemente se produzca la liberación de la DA al espacio sináptico [15].

La DA liberada se une a dos clases de receptores que han sido identificados en base a su especificidad frente a ciertas drogas y clasificados en función de los mecanismos de señalización que utilizan: las familias de receptores del tipo D_1 (D_1R) y del tipo D_2 (D_2R) [16, 17]. Los receptores del tipo D_1 (D_1 y D_5) son receptores asociados a la activación de la enzima Adenilato Ciclasa a través de proteínas G_s , llevando al aumento de la concentración del segundo mensajero Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC) y a la activación de la Proteína quinasa A. Estos receptores presentan baja afinidad frente a algunas drogas antipsicóticas como el sulpiride. Por su parte, los receptores del tipo D_2 (D_2 , D_3 y D_4) fueron definidos originalmente por estar asociados con la inhibición de la liberación de prolactina, y por su alta afinidad por los agentes antipsicóticos; actualmente se los asocia con la inhibición de la Adenilato Ciclasa a través de proteínas G_i/G_o [16, 17]. Los receptores pertenecientes al tipo D_2 pueden encontrarse tanto en la presinapsis como en la postsinapsis; por el contrario, los receptores de la familia D_1 se ubican principalmente en la postsinapsis [17].

Regulación y degradación de la DA

La concentración de DA en el espacio sináptico está estrictamente controlada por una serie de mecanismos diferentes. El proceso más eficiente de eliminación de la DA del espacio sináptico se da a través de los transportadores de DA (DAT) (Fig. 3). Estas proteínas pertenecen a la familia de transportadores acoplados a Na^+ y Cl^- , y trasladan la DA presente en la hendidura sináptica hacia el citoplasma de las terminales presinápticas permitiendo que reingrese a las vesículas a través del VMAT o que sea degradada por la Monoamina Oxidasa (MAO) citoplasmática [12, 16]. El normal funcionamiento de estos transportadores y la rápida recaptación del neurotransmisor

presente en la sinapsis es de vital importancia para la señalización neuronal, permitiendo, por un lado, limitar la duración de la activación de los receptores pre y postsinápticos y la difusión de la DA hacia otras sinapsis y por el otro, posibilitando el reciclado y reutilización de la DA no metabolizada [16]. Diversas drogas pueden afectar el normal funcionamiento del DAT y, por lo tanto, la concentración de DA en el espacio sináptico. Por ejemplo, la cocaína actúa bloqueando la recaptación de DA a través de la interacción con un sitio particular de unión al DAT, distinto al del sustrato, que impide que el neurotransmisor liberado reingrese al interior celular. En tanto que ciertas drogas, como la anfetamina, pueden ser reconocidas como sustrato y competir con la DA por la recaptación dado que el mismo posee una especificidad limitada. Más aun, la anfetamina modifica la actividad del transportador VMAT provocando la liberación de la DA de las vesículas, y su consecuente liberación al espacio sináptico, llevando a un “transporte reverso” del neurotransmisor [12, 16].

Además de ser recaptada, la DA es catabolizada enzimáticamente por la MAO y la Catecol-*O*-metiltransferasa (COMT) (Fig. 3). La enzima MAO presenta isoformas intra y extracelulares. La forma intracelular está asociada a la membrana externa de la mitocondria y es la encargada de metabolizar la DA una vez que es recaptada dentro de la terminal presináptica; mientras que, la forma extracelular actúa metabolizando el neurotransmisor que se encuentra en la hendidura sináptica. En ambos casos, el producto final es el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). La segunda enzima que cataboliza a la DA, la enzima COMT, se encuentra principalmente unida a la membrana sináptica y produce el metabolito 3-*O*-metildopamina (3-MT), el cual convertido por la MAO en ácido homovainilínico (HVA) [16].

Finalmente, la DA también se une a receptores de la familia D₂ que se encuentran en la presinápsis y funcionan como autorreceptores. Esto es, una vez activados, inhiben la síntesis y liberación de dopamina, regulando así la transmisión dopaminérgica [18].

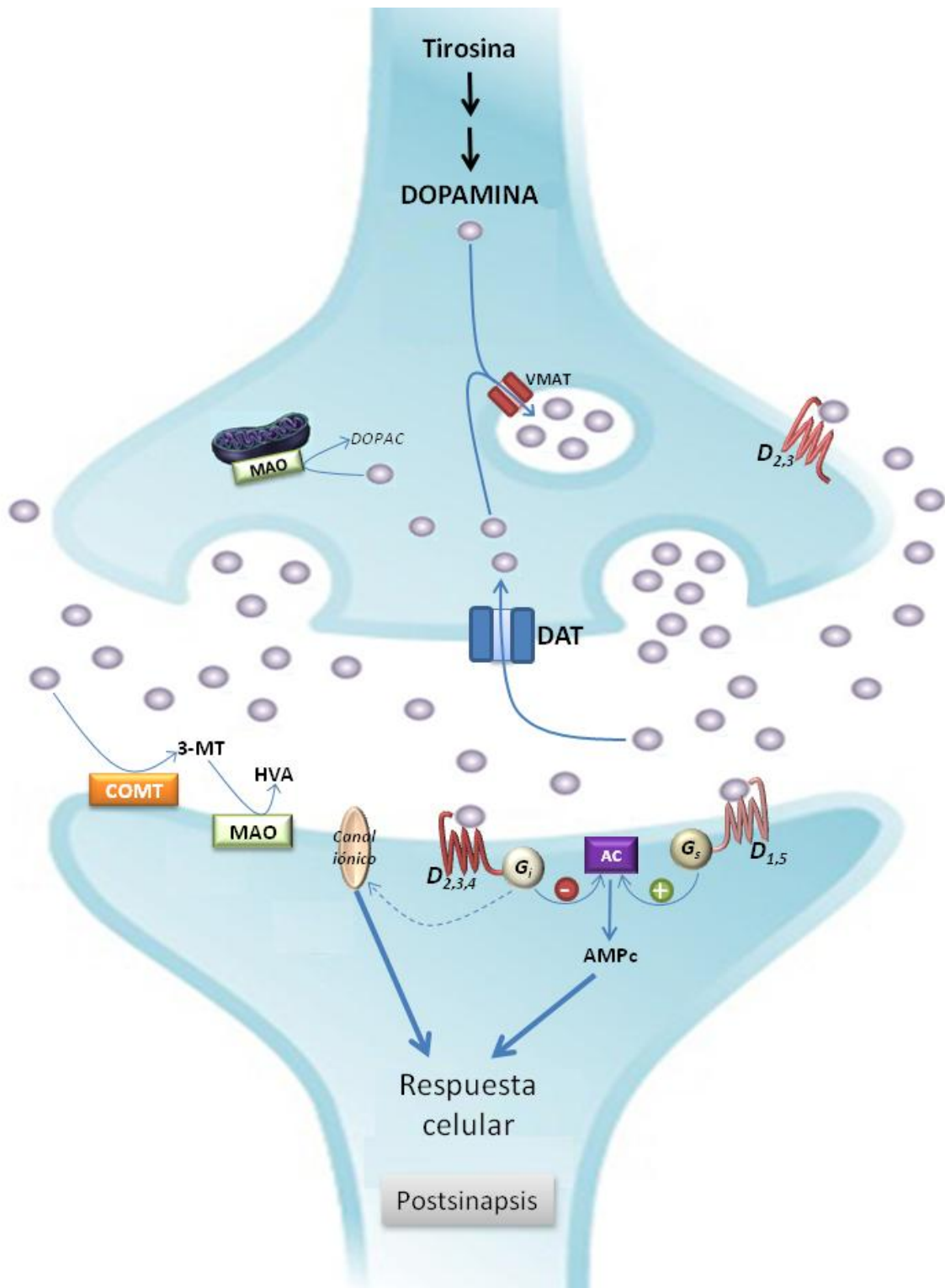


Figura 3: Modelo de sinápsis dopaminérgica: Esquema representativo de la síntesis, liberación, señalización y recaptación de DA. VMAT, transportador vesicular de monoaminas; DAT, transportador de DA; G_i and G_s , proteína G inhibitoria y estimuladora; MAO, monoamina oxidasa; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; COMT, catecol-O-metiltransferasa; 3-ME, 3-O-metildopamina; HVA, ácido homovanilínico; AC, adenilato ciclasa.

VÍAS DOPAMINÉRGICAS CENTRALES

La mayor parte de las neuronas dopaminérgicas del SNC se localizan en tres núcleos discretos cuyas proyecciones dan lugar a distintas vías. Estos núcleos son: la Sustancia Nigra (SN) (área A9) a partir de la cual surge la vía nigroestriatal; el Área Tegmental Ventral (ATV) (área 10) que da lugar a las vías mesolímbica y mesocortical; y, el Núcleo Arcuato (área A12) en donde se origina la vía tuberoinfundibular [12, 19] (Fig. 4).

Vía Nigroestriatal

La vía nigroestriatal (Fig. 4), que se origina en la SN, es fundamental en la organización de los ganglios basales (GB) ya que modula un amplio rango de comportamientos, desde el aprendizaje y la memoria de trabajo, hasta el control motor y aspectos motivacionales del comportamiento. La SN puede ser dividida, en base a su citoarquitectura y a criterios químicos, en dos grupos celulares: la SN reticulada (SNr) y la SN pars compacta (SNc). La SNr contiene neuronas GABAérgicas, mientras que la SNc está constituida principalmente por cuerpos celulares dopaminérgicos que proyectan masivamente hacia el caudado y el putamen, dos núcleos que en conjunto en los roedores se los denomina estriado dorsal (ED), dando lugar a la vía nigroestriatal [20, 21]. La deficiencia de DA en esta vía lleva a desórdenes del movimiento, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la cual se caracteriza por rigidez, aquinesia, bradiquinesia y temblores; mientras que la hiperactividad dopaminérgica sería responsable de varios trastornos hiperquinéticos tales como las disquinesias [19].

Vías mesolímbica y mesocortical

El circuito mesolímbico (Fig. 4) se origina en las células dopaminérgicas del ATV (área A10), las cuales proyectan principalmente hacia el Núcleo Accumbens (NAcc), el tubérculo olfatorio, invirtiendo también el septo, la amígdala (Amíg) y el hipocampo. A su vez, el sistema mesocortical (Fig. 4) se extiende desde el ATV hacia la corteza prefrontal (CPF), la cíngula y la entorrinal [22].

El sistema mesolímbico se encuentra principalmente involucrado en la respuesta a los estímulos de recompensa y la memoria, especialmente la relacionada con aprendizaje por claves y asociaciones con el contexto. El sistema mesocortical está relacionado con la regulación emocional, las funciones cognitivas y de ejecución

especialmente en los procesos de control inhibitorios [2]. Sin embargo, existe una sobreposición entre estos dos sistemas dopaminérgicos, por lo que, por lo general, se los denomina colectivamente como circuito mesocorticolímbico[22] . Debido a la gran cantidad de funciones en la que el circuito mesocorticolímbico está implicado, su disregulación o disfunción está asociada a varios trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia y la depresión, y la adicción a drogas [23, 24].

Vía Tuberoinfundibular

Las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares se ubican en el núcleo Arcuato (área A12) del hipotálamo (Fig. 4) y proyectan ventralmente hacia la Eminencia Media para terminar adyacentes a la circulación hipofisial. La liberación de DA hacia los capilares fenestrados del sistema porta hipofisial permite su transporte a la hipófisis anterior. Las neuronas presentes en este circuito son relativamente pequeñas y secretoras por naturaleza, careciendo de sinapsis verdaderas [25]. Una vez en la hipófisis, la DA inhibe la síntesis y secreción de prolactina. Si el funcionamiento del sistema tuberoinfundibular es perturbado (por la formación de tumores, adenomas o por drogas) los niveles de prolactina pueden aumentar y producir hiperprolactemia. La hiperprolactemia en mujeres se asocia con la galactorrea (secreción de la glándula mamaria) y amenorrea (pérdida de la ovulación y del ciclo menstrual); mientras que en los hombres puede producir galactorrea e impotencia [16].

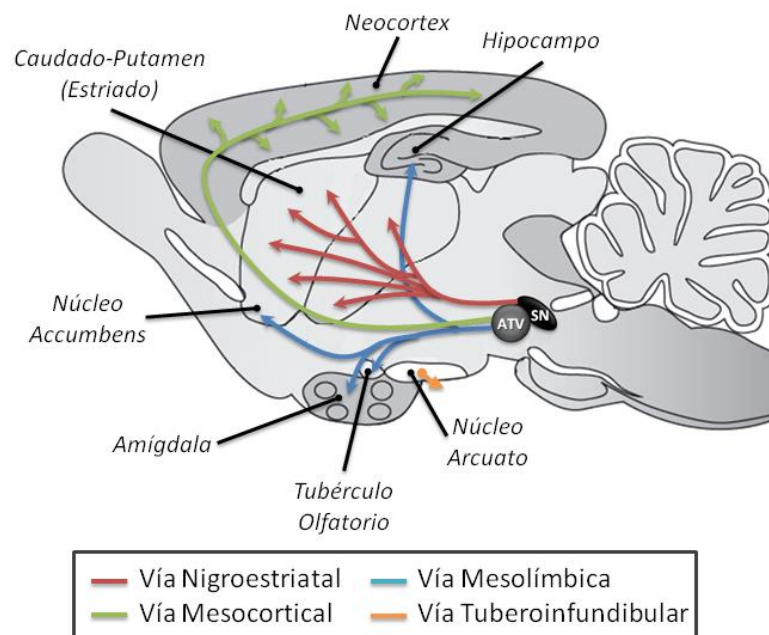


Figura 4: Vías dopaminérgicas centrales. Esquema de las vías dopaminérgicas centrales en un corte sagital del cerebro de rata. ATV, Área tegmental ventral; SN, Sustancia Nigra. Adaptado de Di Giovanni y col en [26].

CIRCUITO DE LOS GANGLIOS DE LA BASE

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales interconectados, críticos en funciones relacionadas con la motivación, la respuesta motora y el aprendizaje procedimental (Fig. 5) [27]. Luego de su descubrimiento en los comienzos del siglo XX, los GB fueron considerados como un simple sistema de integración a través del cual la información cortical llegaba a los núcleos motores del tallo cerebral. Esta perspectiva se basaba en la noción de que en los GB se daba una convergencia de la información que llegaba desde distintas áreas corticales generándose una única salida, compuesta de modalidades funcionales mixtas [28]. Actualmente se sabe que los circuitos neuronales involucrados en los GB son una parte central del sistema motor extrapiramidal y que su mal funcionamiento está asociado con desórdenes neurológicos tales como enfermedad de Parkinson y el Huntington, así como también con el desorden obsesivo compulsivo y la adicción [27, 29, 30].

En este sistema el estriado es el núcleo principal que recibe la aferencias excitatorias glutamatérgicas, así como también una densa innervación desde las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, representando el mayor sitio de plasticidad sináptica en los GB [27]. Además del estriado, los GB del cerebro de los vertebrados consisten en diferentes núcleos, entre los que se encuentran el segmento interno y externo del Globo Pálido (GPi y GPe), los núcleos subtalámicos (NST) y la SN, siendo cada uno de ellos de una profunda importancia clínica [28]. Anatómicamente, el estriado recibe proyecciones excitatorias desde toda la corteza cerebral, pero particularmente desde la CPF y la corteza sensoriomotora. Junto al estriado se ubica el GPi y la SNr, que constituyen los mayores núcleos de salida de los GB, proyectando a través de varios núcleos talámicos, a la mayor parte de la corteza del lóbulo frontal y al tallo cerebral. Ésta arquitectura indica que los GB son parte de un extenso circuito que une la corteza cerebral con el lóbulo frontal [28-30].

La segregación de las proyecciones corticoestriatales permite dividir el estriado en tres partes principales conocidas como territorios sensoriomotor, asociativo y límbico [28, 31]. El territorio sensoriomotor incluye la región dorsolateral postcomisural del estriado que recibe proyecciones de la corteza motora primaria y de la corteza sensoriomotora. El territorio asociativo comprende una gran porción de la parte dorsal del estriado y recibe inervación de las cortezas asociativas de los lóbulos frontal, temporal y parietal. Finalmente, el territorio límbico incluye al NAcc, el tubérculo

olfatorio y la parte ventral y anterior del estriado, y recibe proyecciones de la corteza límbica y paralímbica, la Amígy y el hipocampo. Estas diferencias anatómicas sugieren que, por un lado, distintas partes del estriado pueden contribuir de forma diferencial en el comportamiento, y por el otro, que las funciones estriatales serían altamente complejas [28, 31].

El estriado está formado por células GABAérgicas, siendo la población mayoritaria conocida como neuronas espinosas medianas (NEMs). Las NEMs pueden ser categorizadas en dos subtipos diferentes basándose en su expresión génica y sus proyecciones axonales: aquellas que expresan los D₁R y las que expresan los D₂R [27]. Estos dos tipos celulares se encuentran en cantidades similares y distribuidos al azar a lo largo de todo el volumen del estriado, y representan una división que da lugar a dos vías diferentes: por un lado la “vía directa” en la que las NEMs que expresan los D₁R envían principalmente proyecciones inhibitorias a los núcleo de salida de los GB (GPi/SNr). Por otro lado, la “vía indirecta”, en donde las NEMs con D₂R proyectan hacia el GPe (Fig. 5). Por su parte, el GPe envía proyecciones inhibitorias sobre los NST que, a su vez, emiten proyecciones excitatorias a todas las estructuras de los GB, incluyendo al GPi y a la SNr [32].

El modelo más general del funcionamiento de los GB se basa en una segregación en el procesamiento de la información entre las vías directa e indirecta, las cuales actuarían de forma opuesta en el control del movimiento [28, 33, 34]. De forma anatómicamente simplificada, este modelo describe dos circuitos paralelos (corteza – GB – tálamo – corteza) que divergen en el estriado y son modulados diferencialmente por la DA. Una visión más compleja indicaría que estas vías están integradas dentro de circuitos interconectados, de diferente jerarquía, que surgen desde la corteza límbica y el estriado ventral y proyectan tanto hacia regiones asociativas como motoras [27].

En la vía directa, las NEMs del estriado reciben proyecciones excitatorias glutamatérgicas desde la corteza sensoriomotora y el tálamo, para luego enviar proyecciones GABAérgicas sobre el GPi y la SNr, que a su vez, proyectan hacia los núcleos motores del tálamo. Brevemente, el efecto neto de la activación de la vía directa es la desinhibición de las proyecciones excitatorias talamocorticales, que lleva a la activación de los circuitos corticales premotores y a la selección o facilitación del movimiento. Las NEMs de la vía indirecta forman sinapsis inhibitorias en el GPe, el cual proyecta hacia las neuronas glutamatérgicas de los NST; los cuales envían proyecciones excitatorias a los núcleos inhibitorios de salida de los GB (el GPi y la

SNr). La actividad de la vía indirecta llevaría a una inhibición de las neuronas talamocorticales, lo que reduciría la actividad regulada por la corteza premotora e inhibiría el movimiento [27]. En este modelo, la DA que llega de las neuronas de la SNc sería la responsable de modular la respuesta del estriado, activando a las NEMs D₁R o inhibiendo las D₂R. Esta competencia de vías respondería al modelo de freno - acelerador de un auto, el cual sugiere que la liberación del tálamo (desinhibición) a través de la vía directa es opuesta a la de la vía indirecta, que inhibe el tálamo a través de las proyecciones excitatorias adicionales del NST al GPi [30].

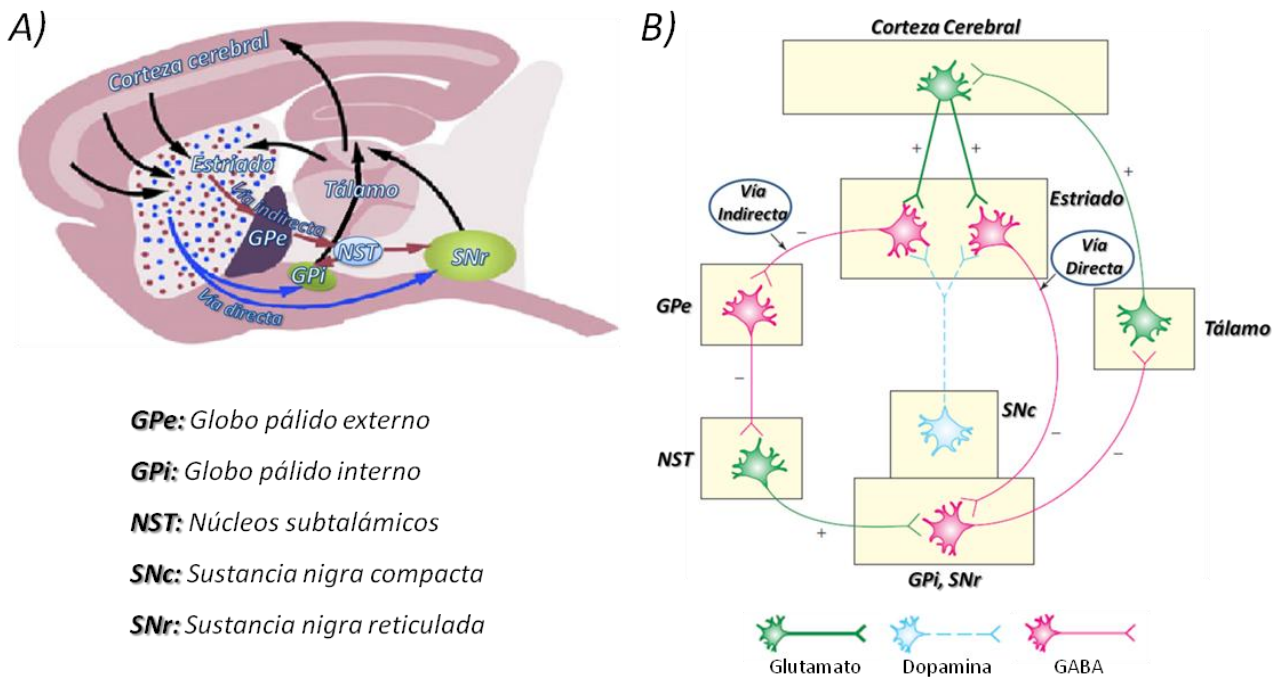


Figura 5: Circuito de los ganglios de la base. A) Corte sagital representando el circuito corteza – GB – Tálamo – corteza en roedores. En la vía directa (flechas azules) las NEMs envían proyecciones directamente a los núcleos de salida de los GB (el GPi y la SNr), donde forman sinapsis inhibitorias. En la vía indirecta (flechas rojas), las NEMs inhiben al GPe, el cual proyecta sobre los NST formando sinapsis inhibitorias. Los axones excitatorios de los NST inervan al GPi y a la SNr, que envían proyecciones GABAérgicas a los núcleos motores talámicos. Finalmente, las neuronas glutamatérgicas del tálamo proyectan a la corteza, completando el circuito (adaptado de [27]). B) El esquema muestra una representación simplificada de las vías directa e indirecta. Las neuronas glutamatérgicas de la corteza inervan a los dos tipos de NEMs GABAérgicas del estriado, las D₁R que proyectan al GPi y a la SNr (vía directa) y a las D₂R que proyectan indirectamente hacia el GPi y la SNr, pasando por el GPe y los NST. La activación de la vía directa por la corteza promovería la actividad motora a través de la inhibición del GPi y la SNr y la consecuente desinhibición del tálamo; por su parte, la activación cortical de la vía indirecta inhibiría la actividad motora a través de la inhibición de los NST por el GPe, y la consecuente activación del tálamo. Las neuronas dopaminérgicas de la SNc modularían estas respuestas (adaptado de [16]).

Dopamina y motivación

El concepto de motivación está relacionado con el principio de autopropagación y de reproducción para la supervivencia de la especie. Los organismos vienen provistos con una habilidad innata para codificar el valor biológico intrínseco de un estímulo y para responder de una manera consistente a este código [35]. La motivación se refiere a aquellos procesos comportamentales a través de los cuales los organismos emiten una respuesta a un estímulo (el estímulo motivacional) en relación con sus consecuencias en términos de la supervivencia individual y de la especie [25].

Dentro del llamado circuito de la motivación muchos neurotransmisores participan regulando su actividad y mediando los distintos procesos controlados por este sistema. Sin embargo, las vías dopaminérgicas del cerebro medio han mostrado tener un rol principal en los comportamientos de motivación. A este respecto, ha sido observado que la administración de antagonistas de receptores dopaminérgicos afecta la respuesta a una serie de reforzadores, incluidos la comida, el agua [36, 37], la estimulación eléctrica cerebral [38, 39] y las drogas de abuso [40-42]. El mapeo de las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas mostró que este efecto está mediado no solo por las proyecciones dopaminérgicas confinadas a las regiones motoras del estriado, sino que también por las que se extendían a áreas límbicas relacionadas con la motivación, particularmente al NAcc, principal componente del estriado ventral [43].

A pesar de la gran cantidad de estudios enfocados en la DA, aún no está completamente claro que información codifica la liberación de este neurotransmisor en el NAcc. Se ha observado que en animales, la inhibición en la síntesis de DA lleva a un impedimento en la utilización de la información sobre la recompensa para motivar comportamientos dirigidos a un objetivo, es decir, para actuar en función de las preferencias [44]. Al mismo tiempo, basándose en esta idea de la necesidad de la DA para la ejecución de comportamientos motivados, se ha propuesto que la neurotransmisión dopaminérgica en el NAcc es la responsable de la asignación de la “importancia del incentivo” y de las claves asociadas a la recompensa, de forma tal que estas claves puedan subsecuentemente disparar un estado de “deseo” por el objetivo, distinto del “placer” que este produce [45]. Un animal entonces, podría recibir placer de algo aún en ausencia de DA; sin embargo, no puede usar esta información para disparar el comportamiento necesario para obtenerlo. La liberación de DA en el NAcc combinaría entonces a las propiedades hedónicas (“placer”) de un objetivo con la motivación (“deseo”) y por lo tanto, tendría una importancia fundamental en la

formación de las asociaciones relacionadas con la recompensa que regulan el comportamiento [46].

Diversa evidencias sugieren que la DA tiene un rol central en los mecanismos asociados con aprendizaje mediado por refuerzos [47, 48]. Es así, que otro modelo de la acción de la DA se basa en la idea de que los animales se comportaran de forma tal de maximizar las recompensas futuras [47, 49]. De acuerdo a esta teoría el cerebro estima el valor de una posible acción en base a la cantidad de recompensa obtenida por esta acción en el pasado y usan estos valores almacenados para predecir la recompensa o castigo resultante para cada acción posible. De esta forma, la recompensa obtenida por la acción se compara con la predicha y la diferencia constituye el “error en la predicción de la recompensa”. Se ha postulado que la DA sería la encargada de codificar este error en la predicción de la recompensa y por lo tanto, modularía los comportamientos futuros de forma de maximizar los beneficios. Este modelo de aprendizaje por reforzamiento es consistente tanto con el rol asignado a la DA en la asignación de la importancia del incentivo, como en la participación asignada a este neurotransmisor en los aprendizajes relacionados a la recompensa [50].

Circuito de la motivación

El *circuito de la motivación* incluye al cerebro medio, al estriado, al globo pálido, y al pálido ventral los cuales forman circuitos paralelos de procesamiento de información motivacional (Fig. 6A). Más específicamente, las porciones ventrales de estos núcleos serían las involucradas en el circuito de la motivación y podrían subdividirse en dos subcircuitos que son paralelos (Fig. 6B), pero que tiene distintas estructuras de entrada y de salida (Fig. 7) [51].

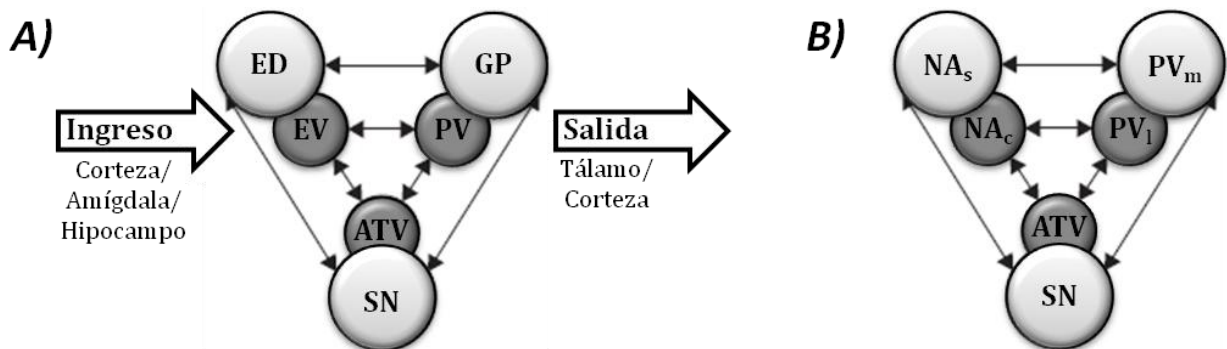


Figura 6: Organización topológica de las proyecciones subcorticales en el circuito de la motivación. ED, estriado dorsal o ventral (EV); GP, globo pálido; PV, pálido ventral medial (PV_m) o lateral (PV_l), SN, sustancia nigra; ATV, área tegmental ventral; NA núcleo accumbens core (NA_c) o shell (NA_s). Adaptado de [51].

Históricamente los estudios biológicos de los comportamientos de motivación se enfocaron en la importancia de una serie de núcleos individuales respecto de la producción de respuestas motoras adaptativas. En este aspecto, la Amíg obtuvo rápida atención debido al hecho de que la ablación bilateral del lóbulo temporal, incluida la Amíg, resultaba en un cambio dramático en las respuestas emocionales. Puntualmente, monos agresivos se volvieron mansos y dispuestos a acercarse a objetos que normalmente le producían temor [52]. Subsecuentemente, animales con lesiones en la Amíg mostraron una disminución en la respuesta de evitación frente a estímulos que indicaban un shock [53], al igual que una reducción en su capacidad de discriminar recompensas alimenticias [54]. Estos estudios, combinados con resultados anatómicos que indicaban que la Amíg está conectada con estructuras motoras, autonómicas y sensoriales [55-57], sugirieron que éste área tiene una función moduladora crítica en los comportamientos de motivación.

La otra región cerebral fuertemente implicada en el control de la motivación es el NAcc. A partir de resultados que mostraron que los animales trabajan para recibir estimulación eléctrica en las estructuras del cerebro anterior [58], particularmente debido a la estimulación dopaminérgica del NAcc [59, 60], junto con la evidencia de que el mecanismo de acción de muchas drogas de abuso dependía del NAcc [61, 62], se postuló un rol central de ésta área en los comportamientos dirigidos a un objetivo. Actualmente, se considera que el NAcc actuaría como una interfaz funcional entre el sistema límbico (incluyendo a la Amíg) y las estructuras motoras dentro de este circuito. [63]. Respecto a la inervación, las neuronas del ATV proyectan hacia el NAcc, el cual a su vez, puede ser dividido en dos porciones: la ventromedial llamada *shell* y la medial, conocida como *core*. De estas dos regiones, el *shell* inerva recíprocamente al ATV, mientras que el *core*, también recibe proyecciones y proyecta sobre la SN. Además, el *shell* proyecta a la porción ventromedial del Pálido ventral (PV_m), mientras que el *core* proyecta principalmente a la región dorsolateral, subcomisural del PV (PV_l). El PV_m inerva GABAérgicamente al ATV, y el PV_l lo hace sobre la SN. A diferencia de la SN, el ATV proyecta sobre ambas regiones del PV [51, 63, 64] (Fig. 7).

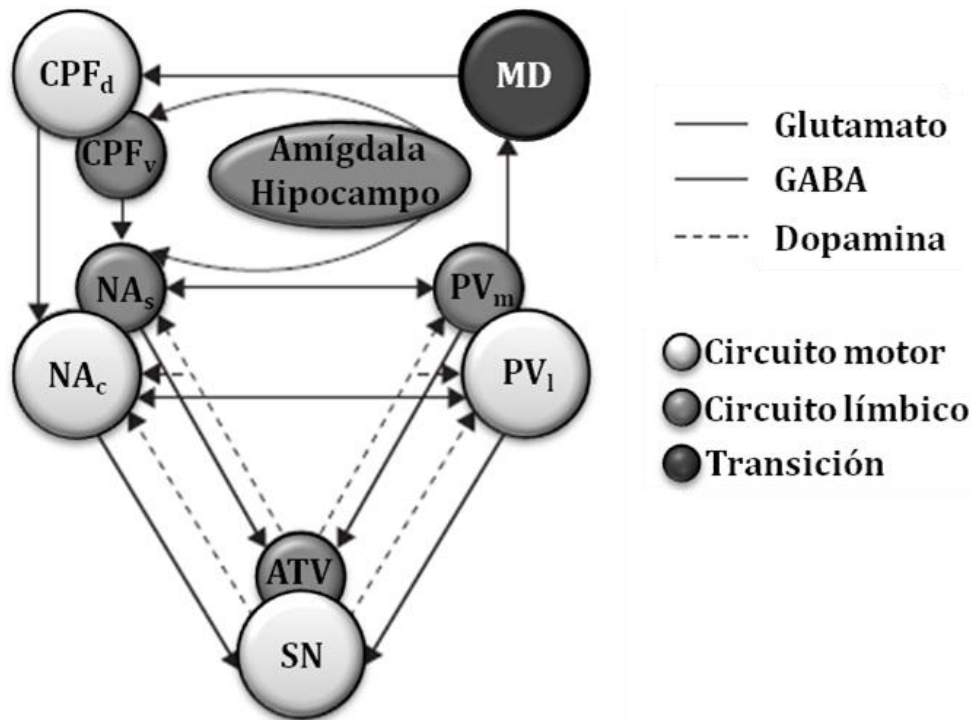


Figura 7: Conectividad en el circuito de la motivación. CPF, corteza prefrontal dorsal (CPF_d) o ventral (CPF_v); MD, tálamo mediodorsal; PV, pálido ventral medial (PV_m) o lateral (PV_l), SN, sustancia nigra; ATV, área tegmental ventral; NA núcleo accumbens core (NA_c) o shell (NA_s). Adaptado de [51].

Las aferencias subcorticales que llegan al circuito provienen principalmente de la CPF, la cual envía proyecciones glutamatérgicas tanto al ATV como al NAcc y la SN. Tanto la parte dorsal (CPF_d) como la ventral (CPF_v) de la CPF reciben a su vez, proyecciones dopaminérgicas mesocorticales del ATV. La amígdala basolateral (ABL) y el hipocampo también envían proyecciones glutamatérgicas sobre el sistema. La ABL proyecta sobre varios núcleos, incluidos el NAcc, la CPF, el ATV, el PV y el tálamo mediodorsal (MD). Por su parte, la ABL recibe proyecciones del ATV, la CPF y el PV. Debido a que la ABL se encuentra también inervada densamente por el tálamo y la corteza sensorial, éste área sería la encargada de integrar información sensorial relacionada con estímulos reforzantes para luego transmitirlos al circuito de la motivación [51, 63, 64] (Fig. 7).

Como fuera mencionado, el circuito de la motivación incluye dos subcircuitos: uno que comprende predominantemente estructuras límbicas y uno relacionado con áreas motoras. Es así que el ATV, el NAcc *shell* y el PV_m están asociados con estructuras límbicas como la CPF_v, la ABL y el hipocampo. Por su parte, la CPF_d, el NAcc *core* y el PV_l forman contactos con estructuras motoras como la SN, la corteza motora y los NST [51, 64]. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos dos

subcircuitos son, en realidad, parte de del amplio set de estructuras que regulan el comportamiento como son los GB. De hecho, el ED ha mostrado jugar un rol crítico en el pasaje del aprendizaje a la formación de hábitos, y este pasaje estaría asociado con un corrimiento desde las estructuras más ventrales y mediales (NAcc *shell*) hacia las zonas más dorsales y laterales (ED o caudado-putamen) [65, 66].

En condiciones normales el organismo utiliza el circuito de la motivación para optimizar las respuestas que aumenten la supervivencia. Sin embargo, muchas drogas de abuso ejercen sus efectos principales precisamente en estas vías y son capaces de inducir alteraciones a largo plazo, o quizás permanentes, en la red motivacional que finalmente dan lugar a la adicción [67].

ADICCIÓN A PSCICOESTIMULANTES

La adicción a drogas es reconocida cada vez más como una enfermedad neurobiológica. El uso repetido de drogas de abuso impacta y afecta al circuito normal de recompensa y de comportamientos adaptativos provocando una serie de cambios plásticos que se manifiestan como comportamientos recurrentes y compulsivos frente a la búsqueda de la droga a pesar de las graves consecuencias adversas. Otras características predominantes en la adicción son la alta vulnerabilidad a la recaída, incluso luego de largos períodos de abstinencia, y la disminución en la motivación para adquirir recompensas naturales de importancia biológica para la supervivencia y para un buen funcionamiento psicosocial [4, 68]. A través de la modificación de los circuitos de la motivación y del aprendizaje, las drogas de abuso alteran las respuestas de los adictos frente a los estímulos ambientales; haciendo que la adicción sea entendida como una enfermedad cerebral crónica marcada por recaídas a largo plazo, que se origina en la compleja interacción de un conjunto de variables. Entre las que podemos citar: el individuo (es decir, factores biológicos como la vulnerabilidad genética y diversos factores psicológicos), a la droga (potencia, ruta de administración y habilidad para generar estímulos condicionados frente a la recompensa) y a los factores ambientales (es decir, legalidad, aceptación y disponibilidad para consumo, presiones de pares, económicas o políticas entre otras [68]).

Al igual que los estímulos biológicos motivacionalmente relevantes, todas las drogas potencialmente adictivas tienen la capacidad de aumentar los niveles extracelulares de DA liberada por el ATV en la CPF, el estriado (incluido el NAcc) y la

Amíg, ya sea de forma directa a través de la inhibición de la recaptación o el aumento de la liberación de DA (como es el caso de la cocaína y la anfetamina), o por mecanismos indirectos que modifiquen la respuesta de células dopaminérgicas (como el caso del alcohol, los opioides, y la nicotina, entre otras) [67, 69]. Sin embargo, existen dos diferencias principales entre la liberación de DA inducida por un estímulo biológico y la generada por el consumo de una droga de abuso. Primero, la liberación de DA provocada por una droga es mayor en amplitud y duración que la que puede lograrse a través de mecanismos fisiológicos. Segundo, se sabe que la liberación de DA por estímulos biológicos desarrolla tolerancia, sin embargo, las drogas adictivas liberan DA cada vez que se consumen [4]. Estas diferencias hacen que el aumento exacerbado y prolongado en la liberación de DA inducido farmacológicamente, produzca una sobreestimación de las claves asociada con la droga frente a aquellos estímulos que anteceden a recompensas de importancia biológica [50]. Esto explicaría por qué el uso repetido de drogas provoca comportamientos de búsqueda cada vez más compulsivos que superan incluso todas las facetas de la vida diaria [4].

A medida que el fenómeno de la adicción progresa desde el uso inicial, al uso descontrolado, los circuitos neuronales y la neuroquímica cambian y la transmisión glutamatérgica aparece regulando los comportamientos de búsqueda de la droga, aunque sin dejar de depender de la influencia de la liberación de DA [4, 70]. En esta transición, la liberación de glutamato (Glu) desde la corteza y la Amíg hacia el circuito motor del estriado (incluido el NAcc) emerge como crítica para ejecutar los comportamientos aprendidos [4, 69, 70]. Más aún, se ha propuesto que a medida que un comportamiento es ejecutado de forma repetida, el rol de las proyecciones glutamatérgicas desde la CPF y la Amíg hacia el NAcc se vuelven menos importantes en relación con las proyecciones que van desde las áreas sensoriales y motoras de la corteza al ED [2, 4]. En el caso de las drogas de abuso, esta transición desde los circuitos prefrontales hacia los circuitos encargados de los hábitos motores significaría una pérdida sobre el control y recaídas compulsivas [2, 70]. Muchos de estos cambios plásticos han sido observados directamente en adictos a través de diversas técnicas de imágenes cerebrales, en donde se encontró una reducción general en el metabolismo celular y el flujo sanguíneo en la CPF [71]. Esta “hipofrontalidad” ha sido caracterizada como un fuerte indicador de una reducción en la habilidad de regular la búsqueda de drogas [4].

Los cambios a largo plazo que se producen en la transmisión glutamatérgica generadas por el consumo repetido de drogas de abuso están asociadas con distintas

modificaciones plásticas. Una pieza clave dentro de estas adaptaciones moleculares es la reducción en el intercambio cistina/Glu (xCT) por las células gliales [72]. Esta liberación no sináptica de Glu es la responsable de mantener una concentración extracelular suficiente para estimular a los autoreceptores presinápticos inhibitorios (los metabotrópicos de tipo II, mGluR_{2/3}) y disminuir, frente a un estímulo, la liberación sináptica de este neurotransmisor [73]. Sin embargo, la reducción en el xCT que se produce en el NAcc luego del consumo crónico de cocaína por ejemplo, eliminaría esta inhibición tónica, aumentando la probabilidad de liberación sináptica de Glu en esta área frente a un nuevo contacto con la droga [74]. Esta reducción en los niveles basales de Glu también llevaría a una disminución en la expresión de sus transportadores gliales y a un incremento de los niveles de los receptores ionotrópicos del tipo AMPA en la membrana postsináptica [74]. Más aún, esta desregulación en la neurotransmisión glutamatérgica llevaría a neuroadaptaciones postsinápticas duraderas como son el cambio en la densidad de espinas en el NAcc y en áreas de la CPF [5] que estarían relacionadas a su vez con un incremento en el ciclo de la actina [75], e involucrarían al citoesqueleto de actina [4, 76].

Modelos comportamentales de adicción a psicoestimulantes

Dentro de las drogas psicoactivas ilegales de mayor poder adictivo y mayor consumo a nivel mundial se encuentra la cocaína. Se ha observado que el consumo de cocaína termina en adicción en una gran cantidad de individuos: alrededor del 5-6% de los usuarios se vuelve dependiente durante el primer año de uso, mientras que el 15-16% lo hace dentro de los 10 años [77, 78]. El uso de modelos animales ha sido crítico para la investigación de los distintos mecanismos involucrados en este fenómeno.

Dentro de los modelos animales utilizados para estudiar la adicción a drogas se incluyen aquellos en los que la droga es administrada por el experimentador (no contingentes), y en los que el animal se autoadministra la droga (contingentes). La sensibilización comportamental es un modelo de administración no contingente que fue desarrollado en los '80, y ha sido muy utilizado para evaluar modificaciones plásticas inducidas por las drogas. Si bien su participación en los comportamientos de búsqueda de droga y reincidencia durante la adicción es aún debatible, gran cantidad de evidencias han demostrado que los cambios que se producen tanto en los circuitos neuronales, como en los mecanismos neuroquímicos y neurofarmacológicos, son similares a los que ocurren durante la autoadministración, postulando la utilidad que la

sensibilización tiene para determinar las bases a través de la cuales las drogas de abuso alteran la función neural [11, 79].

Sensibilización inducida por psicoestimulantes

La sensibilización motora se define como el aumento sostenido en la respuesta motora resultante de la administración repetida de psicoestimulantes [80, 81]. Si bien en sus comienzos el término solo se refería al aumento de los efectos motores de las drogas psicoestimulantes, actualmente se sabe que este aumento involucra modificaciones en la neurotransmisión de las distintas áreas relacionadas con la recompensa, la motivación y con los comportamientos de búsqueda y consumo de drogas, es decir, en las áreas del circuito de la motivación [63, 80-82]. Se ha propuesto que estos cambios neuroadaptativos serían los responsables de volver al cerebro hipersensible frente a la asignación del valor motivacional del incentivo y la recompensa respecto a la droga y de los estímulos ambientales asociados con la droga [81]. La sensibilización ha mostrado también una importante característica de la adicción: la persistencia. Se ha observado que en animales la sensibilización puede persistir meses y hasta años luego de discontinuar el tratamiento con la droga [80].

La sensibilización comportamental puede ser dividida en dos etapas: *desarrollo* y *expresión*. Cada una de estas está asociada con un determinado período del tratamiento y con neuroadaptaciones específicas en distintas regiones cerebrales [63].

Desarrollo de la sensibilización

El desarrollo de sensibilización comportamental se define como la secuencia transitoria de eventos moleculares y celulares precipitada por la administración de un psicoestimulante y que deriva en cambios duraderos en la función neural responsables del aumento en la respuesta motora [63]. Basándose en resultados obtenidos en animales tratados mediante inyecciones intracraneales de anfetamina, se determinó que la acción de las drogas sobre el ATV era la responsable del desarrollo o inducción de la sensibilización. Además, utilizando lesiones de áreas específicas se demostró que la CPF también juega un papel fundamental durante esta etapa de la sensibilización [11]. Puntualmente, los estudios iniciales realizados con microinyecciones de anfetamina en el ATV, mostraron que el tratamiento repetido resultaba en respuestas sensibilizadas frente a una inyección sistémica de anfetamina o cocaína, aun cuando no se observaban efectos agudos en la actividad locomotora [83, 84]. Evidencias posteriores revelaron

que el desarrollo de sensibilización comportamental está acompañado por una serie de cambios funcionales en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, entre los que se incluyen una subsensibilidad de los receptores somatodendríticos en el ATV, un aumento de la habilidad de los psicoestimulantes para incrementar los niveles extracelulares de DA en el NAcc y una disminución en la transmisión dopaminérgica en la CPF [11, 85, 86]. Si bien la investigación sobre el fenómeno de la sensibilización se ha enfocado principalmente en las vías mesocorticolímbicas, también se han observado modificaciones en el sistema nigroestriatal, como por ejemplo, un aumento en la liberación de DA en el ED y una menor sensibilidad de los autoreceptores somatodendríticos de la SN [85]. También los receptores de ionotrópicos de Glu del tipo NMDA han sido ampliamente involucrados en el desarrollo de sensibilización ya que la coadministración de antagonistas competitivos, no competitivos o parciales junto al tratamiento con cocaína produce el bloqueo de la sensibilización y las neuroadaptaciones asociadas a este proceso [87-91]. Estos resultados indican que la transmisión mediada por los receptores NMDA sería necesaria desde el comienzo y estaría asociada a la cascada de cambios celulares que llevan a la sensibilización [85]. Al igual que en el caso de los receptores NMDA, la coadministración de antagonistas de los receptores de Glu del tipo AMPA junto con el tratamiento con cocaína también previene el desarrollo de la sensibilización [92, 93] junto con las modificaciones asociadas [90], indicando también una participación de estos receptores en esta etapa de la sensibilización.

A lo largo de los años diversas investigaciones han esclarecido la participación de las distintas áreas del circuito de la motivación durante el desarrollo de la sensibilización. Por ejemplo, se determinó que el tratamiento repetido con cocaína produce un aumento en la excitabilidad de las neuronas del ATV que se asocia con una disminución de la sensibilidad de los D₂R [94, 95]. Esta modificación en la función de los D₂R llevaría a un incremento en los niveles de DA que se une a los D₁R de esta región, produciendo un aumento de la liberación de Glu y, consecuentemente, activando aún más a las neuronas dopaminérgicas [11, 96, 97]. Se ha demostrado también que infusiones de cocaína, de inhibidores de la recaptación de DA [98] o de agonistas de los D₁R en el ATV [99] llevan al desarrollo de la sensibilización frente a una inyección sistémica de la droga. Los receptores de Glu también han mostrado estar involucrados durante esta etapa puesto que la administración de un antagonista competitivo de los receptores NMDA directamente en el ATV, en paralelo a un tratamiento sistémico con

cocaína, previene el desarrollo de sensibilización [88]. Mientras que, la infusión intra-ATV de AMPA o de agonistas de los receptores metabotrópicos lleva a la inducción de la sensibilización [100].

En el NAcc, el tratamiento repetido con cocaína produce un incremento en la sensibilidad de la respuesta mediada por los receptores D_1 [101]; y, la infusión de agonistas D_1 de forma área específica aumenta la capacidad de un tratamiento sistémico con cocaína de desarrollar la sensibilización indicando que la activación de estos receptores en el NAcc participaría durante esta etapa de la sensibilización [102].

La importancia de la CPF quedó demostrada a través de diversos experimentos en los que animales con lesiones en éste área no desarrollaban la sensibilización a cocaína [90, 103, 104]. Sumado a esto, se determinó también que la estimulación eléctrica de la CPF era suficiente para desarrollar la sensibilización [105]. Si bien su participación en este período es clara, los mecanismos involucrados no lo son tanto. Se ha observado que la sensibilización atenúa significativamente el aumento en la concentración de DA en la CPF medial (CPF_m) inducido por la cocaína [106, 107], debido a un incremento en la capacidad de remoción del DAT [106, 108]. En relación a esto, también se encontró que la reducción de los niveles de DA en la CPF, a través de inyecciones de 6-hidroxidopamina, induce respuestas comportamentales sensibilizadas a cocaína y aumenta la liberación de DA en el NAcc [109]. Si bien, la infusión de agonistas de los D_1R no ha mostrado efectos sobre el desarrollo indicando que estos receptores no estarían directamente involucrados en esta etapa [110], los receptores de D_2 sí jugarían un rol importante. Ha sido comprobado que la sensibilización está relacionada con un aumento en la excitabilidad de las membranas de las células piramidales de la CPF_m [111] y una disminución en la función de los receptores D_2 en éste área [110, 112, 113]. Más aún, se ha demostrado que la disminución funcional de los D_2R lleva a una pérdida del control excitatorio de las proyecciones glutamatérgicas que van desde la CPF_m hacia el NAcc y el ATV [114]. Sumado a esto, se ha determinado que el tratamiento con cocaína está asociado a mayores cantidades de Glu en la CPF_m y consecuentemente en áreas subcorticales como el NAcc y el ATV [115]. Resultados experimentales obtenidos utilizando infusiones intra-CPF_m de un agonista de los $mGluR_{2/3}$ (receptores metabotrópicos inhibitorios de Glu) indicaron que el desarrollo de sensibilización estaría relacionado con una disminución en la funcionalidad de estos receptores [116], confirmando que la sensibilización resultaría, en parte, de una reducción de la regulación inhibitoria de las neuronas piramidales de la CPF_m que lleva

a un aumento en la transmisión excitatoria sobre el NAcc [117]. En este punto es importante destacar que la pérdida de la función de los receptores inhibitorios de la CPF_m, incluidos los D₂R, y los mGluR_{2/3}, podría deberse a un aumento en la proteína AGS3 (del inglés Activator of G-protein Signaling 3). AGS3 es un inhibidor de la disociación de la proteína G_{oi} altamente conservado, y se ha observado que su expresión se encuentra incrementada en la CPF luego de un tratamiento crónico con cocaína [4, 116, 118].

Expresión de la sensibilización

La expresión de la sensibilización se define como las alteraciones neuronales duraderas que se originan tanto en el desarrollo como luego de un período de abstinencia y que median la respuesta comportamental aumentada frente a un nuevo contacto con la droga [63]. Existe una marcada dependencia del tiempo en la respuesta comportamental y las neuroadaptaciones asociada con la expresión de la sensibilización. Es decir, luego de interrumpida la administración de la droga, se dan una serie de cambios plásticos transitorios que llevarán finalmente a la adaptaciones duraderas que median la hipersensibilidad y la persistencia de la respuesta frente a la droga [119].

Dentro de los cambios a largo plazo se encuentran modificaciones relacionadas con la neurotransmisión dopaminérgica fundamentalmente en el NAcc [119]. Se ha determinado que largos períodos de abstinencia aumentan la habilidad de las drogas psicoestimulantes de incrementar los niveles extracelulares de DA en el NAcc [120, 121], y que este efecto es bloqueado mediante la administración sistémica de antagonistas de canales de Ca²⁺ [122] indicando una participación de fosfoproteínas Ca²⁺-dependientes. Se demostró que la utilización de un inhibidor de la enzima Ca²⁺-calmodulina quinasa II (CaMKII) en el NAcc tiene como consecuencia un menor incremento en la liberación de DA provocado por una inyección de anfetamina en animales previamente tratados con cocaína [123], así como también un bloqueo en la expresión de la sensibilización comportamental inducida por cocaína [63]. Además de esta participación de las proteínas Ca²⁺-dependientes en la liberación de DA, se ha observado que en el NAcc *shell* existe una disminución en la densidad de los DAT [124] que se correlacionaría con el aumento de DA provocado por las drogas psicoactivas [125]. Por su parte, la densidad y función de los autoreceptores del tipo D₂ en el NAcc no parece estar alterada [126, 127] y, por lo tanto, no contribuiría

directamente en el aumento de la liberación de DA observada en esta etapa de la sensibilización [63].

Se ha propuesto también que la expresión de la sensibilización estaría relacionada con una alteración en la capacidad de respuesta a la DA por las células del NAcc [119], que no involucraría una modificación en la densidad de expresión de sus receptores [63]. Utilizando diferentes análisis funcionales, se ha observado una supersensibilidad de los receptores D₁ luego de largos períodos de abstinencia [101, 128, 129]. Sin embargo, no se han observado efectos al administrarse agonistas de los receptores D₁ de forma sistémica [130] o intra-NAcc [125] sobre la respuesta comportamental de animales previamente tratados con psicoestimulantes, indicando que si bien la estimulación de estos receptores en el NAcc es necesaria, por sí sola no sería suficiente para desencadenar la expresión de la sensibilización [63, 119].

Como fuera previamente mencionado luego de la abstinencia de un tratamiento repetido con cocaína los niveles basales de Glu en el NAcc están reducidos [72] y la reexposición a la droga produce un aumento en la liberación de este neurotransmisor que se asociaría con la expresión de la sensibilización [117]. Es así que antagonistas sistémicos de los receptores NMDA bloquean la expresión de la sensibilización [92] y la administración intra-NAcc de agonistas de estos receptores, en ratas pretratadas con cocaína, induce la respuesta de sensibilización [131]. Estos efectos están acompañados de resultados que muestran que largos períodos de abstinencia están asociados con un aumento en la expresión de las distintas subunidades de este receptor [132-134]. Respecto a los receptores de Glu del tipo AMPA, se ha observado que si bien el tratamiento sistémico con antagonistas no logra bloquear la expresión de la sensibilización [92, 93], este efecto si es alcanzado mediante la administración de antagonistas directamente sobre el NAcc [117]. De igual manera, se ha observado que en ratas que desarrollaron la sensibilización, la infusión intra-NAcc de AMPA luego de 2 a 3 semanas de abstinencia, induce respuestas locomotoras aumentadas [117, 131]. La expresión en la superficie de los receptores AMPA en el NAcc aumenta durante la primera semana luego de cesado el tratamiento y permanece elevada hasta al menos 21 días en aquellos animales que desarrollaron la sensibilización [132, 135, 136]. El mecanismo por el cual se produce este aumento en los niveles de AMPA no es claro, sin embargo se ha sugerido que podría estar asociado a una respuesta plástica que surgiría para compensar la disminución en el Glu extracelular que se produce luego de la abstinencia [72, 135, 136]. Funcionalmente, si bien este incremento se correlaciona con

la magnitud de la respuesta de sensibilización motora [136, 137], podría estar también relacionado con un aumento en las propiedades motivacionales frente a los estímulos asociados con la droga [80, 138]. Es importante destacar que esta plasticidad de los receptores AMPA ha mostrado ser bidireccional, ya que el aumento observado durante los períodos sin contacto con la droga se ve revertido 24 hs luego de una inyección con cocaína [135, 136] y la consecuente liberación de Glu asociada en el NAcc [139]. Sin embargo, la expresión de receptores AMPA se recupera a niveles pre-inyección luego de un nuevo período de abstinencia, avalando la participación de este tipo de receptores en la plasticidad comportamental persistente asociada con el modelo de sensibilización [132, 139].

Durante la expresión de la sensibilización la transmisión glutamatérgica está directamente implicada, y por lo tanto, también las proyecciones que surgen de la CPF [119]. Es así que lesiones bilaterales de la parte dorsal (pero no ventral) de la CPF_m bloquea la expresión de la sensibilización a cocaína, así como también el incremento de Glu asociado en el NAcc [140]. Consistentemente, se ha sugerido que el tratamiento crónico con cocaína produciría modificaciones a largo plazo sobre los receptores metabotrópicos de tipo I y II en la CPF que llevaría a la hipersensibilidad en la respuesta frente a un nuevo contacto con la droga de las proyecciones que la CPF_m emite sobre el NAcc [141].

Cambios plásticos estructurales asociados a la exposición a cocaína

La persistencia en los comportamientos compulsivos de búsqueda de la droga indicaría que estas sustancias adictivas tienen la capacidad de provocar cambios duraderos en el cerebro y que estos cambios serían los que modulan los fenotipos de pérdida de control en las personas adictas [4, 68]. Avalando esta hipótesis existen datos que muestran que la exposición a todas las sustancias potencialmente adictivas resulta en una modificación dramática del patrón de expresión de genes de en áreas centrales del sistema de recompensa [142]. De forma similar, investigaciones tempranas establecieron que uno de las formas más robustas de plasticidad neuronal asociada a la administración repetida de psicoestimulantes es la reestructuración duradera de los árboles neuronales y de las espinas dendríticas [143].

Si bien el modelo de administración de la droga (contingente o no contingente) influye en los resultados obtenidos, postulando que la voluntad sería un componente importante en algunos aspectos de la plasticidad, en líneas generales para el caso de la cocaína, los

efectos obtenidos con ambas formas de tratamientos son similares [5]. Resultados obtenidos en roedores han mostrado consistentemente que los psicoestimulantes aumentan la densidad y complejidad de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales glutamatérgicas de la CPF_m [144-147]. Sin embargo, la mayor cantidad de investigaciones se ha centrado en la evaluación de las NEMs del NAcc, permitiendo incluso examinar en detalle los cambios morfológicos en células que expresan los D₁R o los D₂R. Los resultados de estos análisis han mostrado que si bien la inducción de las espinas dendríticas luego de un tratamiento repetido con psicoestimulantes ocurre en ambas poblaciones celulares [5, 147, 148], la mayor estabilidad y permanencia de estas nuevas espinas se daría en las neuronas D₁R [149-151]. Estas alteraciones de mayor persistencia en las células que expresan los D₁R ya han sido observadas en otras formas de plasticidad y podrían ser una característica importante y selectiva de la neurofisiología de la adicción [152]. Si bien el mecanismo que regula estas modificaciones estructurales no está del todo claro, la regulación del citoesqueleto de actina parecería estar involucrada [4]. De acuerdo con esto, se ha observado un aumento persistente en el ciclo de la actina luego del cese de un tratamiento crónico con cocaína [75]. Además, se ha postulado que estos cambios en la morfología involucrarían la modificación de la actividad de GTPasa pequeñas, así como la inducción de diferentes genes y sus blancos (por ejemplo, Δ FosB, NF κ B, Cdk5-MEF2, etc) [153].

Muchos de estos mecanismos moleculares involucrados en los cambios plásticos asociados a la adicción a cocaína son similares a aquellos que se observan durante el desarrollo del sistema nervioso [5] y por lo tanto podrían involucrar, entre otras, a las vías de señalización de los factores Wnt.

FACTORES WNT Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Los factores Wnt (de inglés, *Wingless-related integration site*) [154] son glicoproteínas de secreción con una inusual modificación postraducciona (el agregado de ácido palmítico en una cisteína conservada) que es esencial para su funcionamiento [155]. Los Wnt son proteínas señalizadoras que funcionan como importantes mediadores de la comunicación intercelular y su participación es crucial para el normal desarrollo embrionario, así como para el desarrollo del sistema nervioso [6]. Durante esta etapa, las proteínas Wnt participan en la especificación del eje antero-posterior durante el desarrollo de la placa neural dentro del embrión, regulan la morfogénesis del

tubo neural, modelan la proliferación, diferenciación y migración de las células madres neuronales, participan en el crecimiento y guiado axonal, así como en el desarrollo de las dendritas y en la formación de sinápsis [6, 156]. En el cerebro adulto participan en la regulación de la neurogénesis, la estabilidad sináptica y la plasticidad, y su alteración está asociada con desórdenes del SNC, tales como el trastorno bipolar, la esquizofrenia y el Parkinson, entre otros [157].

Las vías de señalización de Wnt involucran una serie de componentes que se encuentran bajo diversos pasos regulatorios. La familia de proteínas Wnt incluye a 19 miembros dentro de los mamíferos y la familia de receptores clásicos de estos factores son los denominados Frizzled (Fz) de siete dominios transmembrana. Además, se han descrito diversos correceptores como los asociados a la lipoproteína de baja densidad 5/6 (LRP5/6), el receptor huérfano de un paso transmembrana del tipo tirosina quinasa (ROR) y el receptor tirosina quinasa (RYK), entre otros [7]. El modelo actual propuesto involucra la activación, a través del complejo Wnt-Fz, de una proteína intracelular llamada Dishevelled (Dvl) que es capaz de agrupar a los diferentes componentes de al menos tres vías de señalización distintas: la vía de polaridad celular planar (PCP), la vía Wnt/Ca²⁺ o la vía canónica o Wnt/βcatenina (Fig. 8) [6].

La vía PCP fue primero identificada en *Drosophila* en donde participa de la regulación de la polaridad de los tejidos y la migración celular durante el desarrollo. Esta vía señala a través de la activación de las GTPasas pequeñas, Rho y Rac, que luego estimulan a ROCK y JNK respectivamente. Los efectos de la activación de esta vía están relacionados con la regulación de la organización del citoesqueleto, la movilidad celular y la expresión de distintos genes dependientes de JNK, por ejemplo los genes regulados por el factor activador de la transcripción 2 (ATF-2). La vía del Ca²⁺ es una vía dependiente de proteína G, la cual lleva a la activación de la fosfolipasa C que tiene como resultado la liberación de Ca²⁺ intracelular. Este incremento en la concentración de este catión lleva a la activación de proteínas tales como la CaMKII, calcineurina y la proteína quinasa C. En este proceso muchos factores de transcripción son activados, incluyendo a la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) [6, 7, 156]. La vía canónica de Wnt es, dentro de las tres, la más estudiada y conservada a través de la evolución, mostrándose presente en el cerebro adulto, en la cual participaría de forma muy importante en el mantenimiento de las conexiones neuronales a lo largo de toda la vida [158].

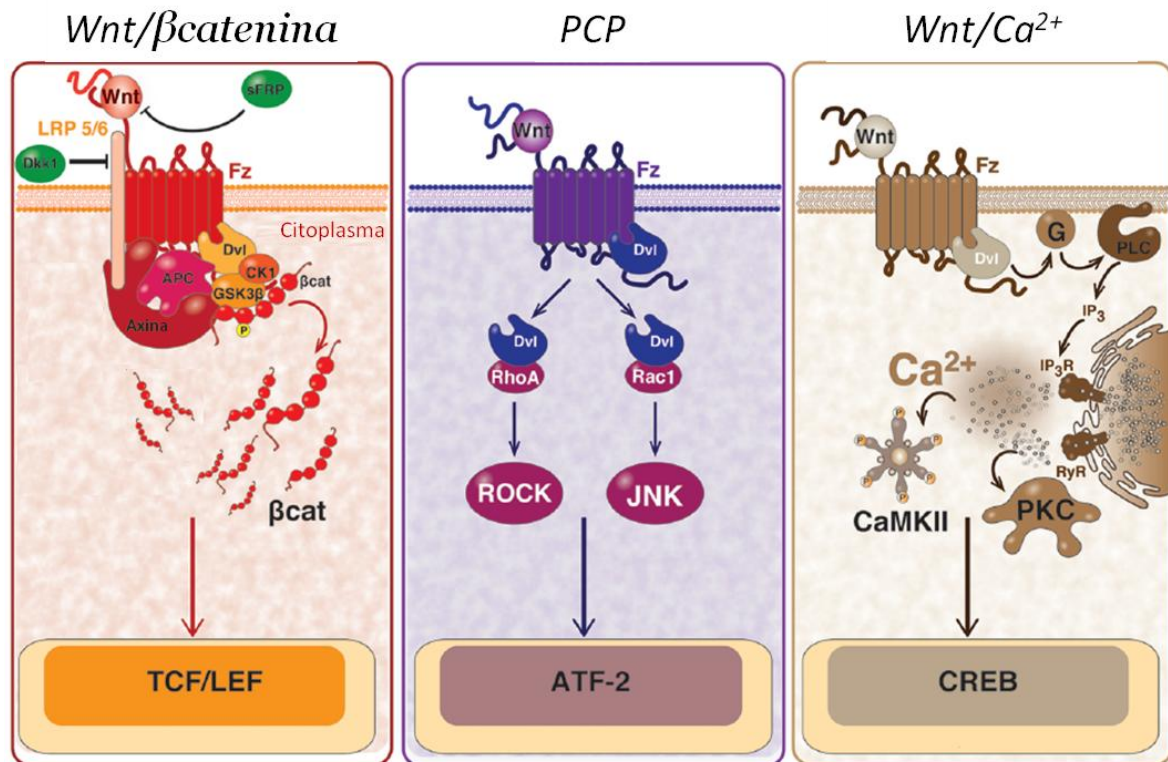


Figura 8: Vías de señalización de los factores Wnt. Adaptado de [7].

Vía canónica de Wnt o Wnt/βcatenina

La vía de señalización canónica de Wnt tiene un rol fundamental en la proliferación de progenitores neuronales durante el desarrollo del SNC como así también durante la sinaptogénesis. En los últimos años, diversos estudios realizados tanto en humanos como en roedores, han demostrado que la vía canónica de Wnt tiene además gran importancia en desórdenes neuropsiquiátricos tales como la esquizofrenia, el desorden bipolar y los trastornos del espectro autista, como así también en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer [7, 157].

La vía canónica de Wnt actúa regulando la cantidad de una proteína que funciona como coactivador transcripcional, la βcatenina, a través de un complejo de destrucción que tiene un rol fundamental en la respuesta final generada por la vía [6]. La proteína supresora de tumores Axina funciona como una plataforma de este complejo interactuando con la βcatenina, la proteína supresora de tumor poliposis adenomatosa coli (APC) y dos serina-treonina quinasas constitutivamente activas, la caseína quinasa 1α (CK-1α) y la glucógeno quinasa sintasa 3β (GSK3β) [7]. La APC es una gran proteína que interactúa tanto con la βcatenina como con la Axina a través de tres

motivos de unión a Axina que están intercalados por repeticiones de 15 a 20 aminoácidos que se unen a la β catenina [159].

En ausencia de los factores Wnt, la CK-1 α y la GSK3 β fosforilan secuencialmente a la β catenina que se encuentra asociada a la Axina. La fosforilación se produce en una serie de residuos serina-treonina ubicados el extremo N-terminal que luego son reconocidos por el complejo de la ubiquitina ligasa E3. Este complejo marca a la β catenina para su rápida destrucción por el proteosoma [160], evitándose así la activación de los genes blanco en el núcleo (Fig. 9). La unión de un factor Wnt al receptor Fz y la subsecuente asociación del correceptor LPR5/6, recluta a la Axina a la cola citoplasmática fosforilada del LPR, permitiendo que la β catenina se acumule y se transloque al núcleo para activar a sus genes diana (Fig. 8 y 9) [161].

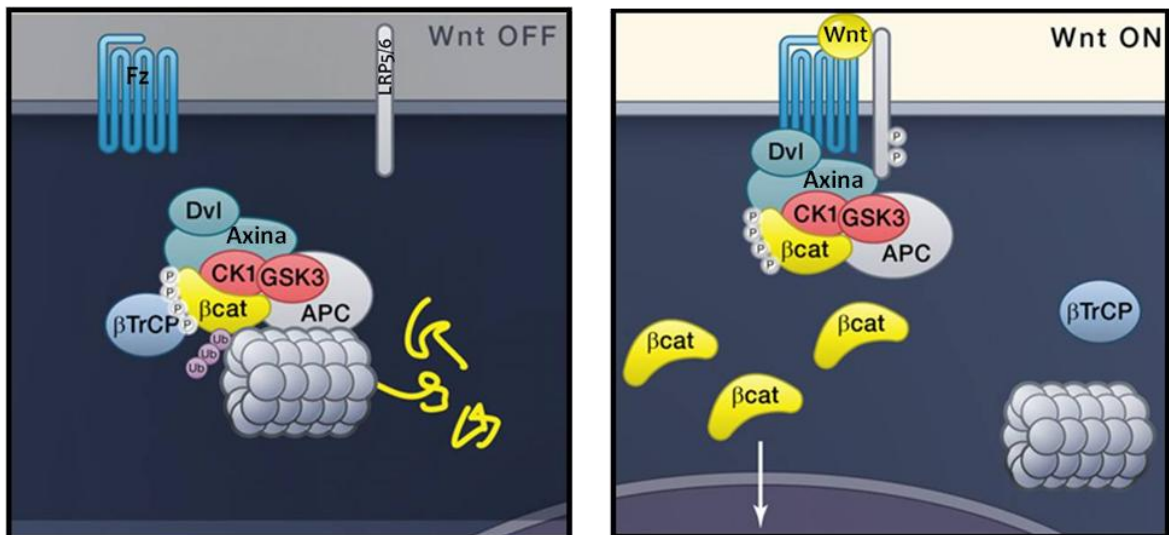


Figura 9: Vía canónica o Wnt/ β catenina. Adaptado de [159].

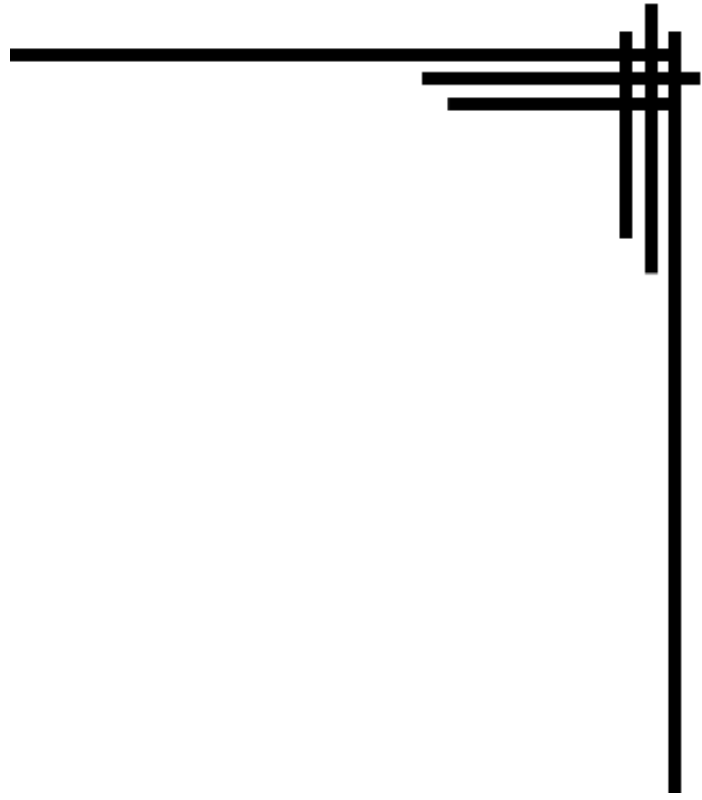
El resultado final de la activación de la vía canónica de Wnt es la expresión de los genes regulados por la β catenina, el factor de células T (TCF) y el factor aumentador linfoide (LEF) [7]. Mientras que la mayoría de los genes activados por este complejo nuclear son específicos de cada tejido o de una etapa particular del desarrollo, la expresión del gen de la *Axina2* es general y por lo tanto se la considera como un indicador de la actividad de la vía [162].

Además de su rol en la vía canónica, la β catenina cumple una función estructural, interaccionando con distintas caderinas en las uniones de adhesión. Si bien se ha debatido ampliamente sobre este rol dual entre las funciones de adhesión y señalización, actualmente se ha planteado la existencia de reservas independientes de

β catenina, cada uno de los cuales estaría implicado en una función en particular [159, 163, 164].

VÍA CANÓNICA, DESÓRDENES NEUROPSIQUIÁTRICOS Y ADICCIÓN

En los últimos años evidencias crecientes involucran a la vía canónica y a sus efectores en diversos desórdenes psiquiátricos, relacionando la ausencia o deficiencia de algunas de las proteínas relacionadas con la vía (como Frizzled-3, GSK3 β y el regulador de su actividad, Akt) con la susceptibilidad frente al desarrollo de neuropatologías tales como Alzheimer y esquizofrenia [7-10]. A pesar de que la adicción a cocaína, al igual que la esquizofrenia, afecta al sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, no se había propuesto una participación de las vías de señalización Wnt durante la adicción. Dentro de las observaciones que sugerirían una posible relación entre el uso repetido de drogas y los efectores de las vías de Wnt podemos citar: que tanto la administración de anfetamina como de antagonistas de receptores dopaminérgicos, modifican la expresión de la β catenina y la GSK3 β en áreas del cerebro que contienen cuerpos neuronales dopaminérgicos tales como en el ATV y la SN [165, 166]. Más aún, estudios *in vitro* han demostrado que antagonistas de los receptores dopaminérgicos del tipo D₂ (drogas antipsicóticas) modifican la expresión de los efectores de la vía canónica de Wnt a través de Dvl [167]. Particularmente para el caso de la cocaína se observó que en animales adultos, la administración crónica de esta droga induce cambios en la actividad de GSK3 β que estarían relacionados con la sensibilización comportamental [168-171]. Si bien los trabajos citados involucran a distintos efectores de la vía canónica de Wnt en mecanismos relacionados con el fenómeno de adicción, en ninguno de los casos anteriores los autores proponen a la vía de señalización Wnt/ β catenina como un posible blanco de acción de los efectos de la cocaína.

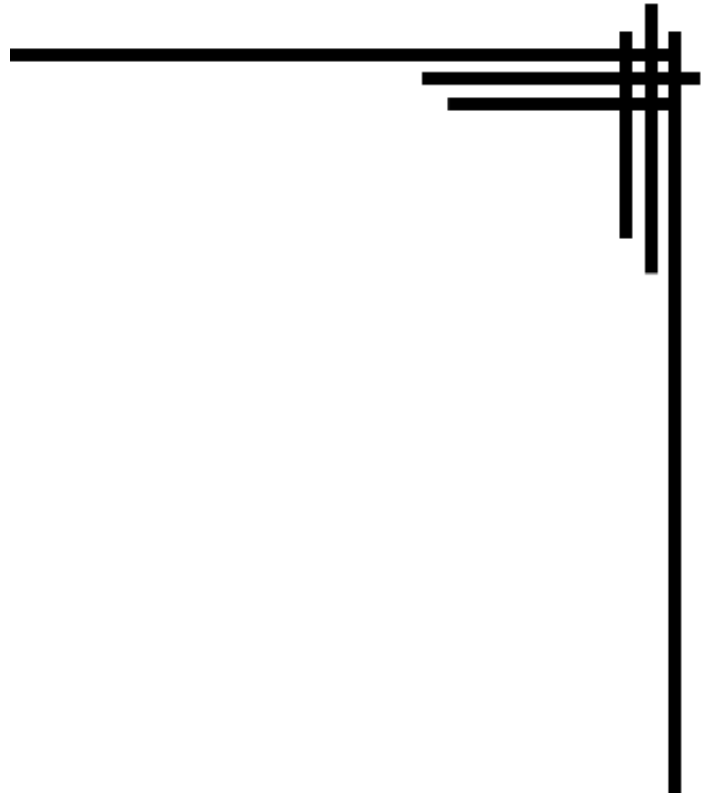


OBJETIVOS

La adicción a drogas es un problema mundial no resuelto que afecta no sólo a la persona que consume sino a todo su entorno. Particularmente para el caso de la dependencia de cocaína, hasta la actualidad no se ha establecido una medicación eficiente para su tratamiento, por lo que el estudio de las bases moleculares que median la adicción sigue revistiendo gran importancia tanto a nivel clínico como social. Si bien se ha demostrado que la vía canónica de Wnt estaría involucrada en una serie de mecanismo similares a los que dan lugar a los cambios plásticos asociados con la adicción, hasta la fecha no se ha propuesto una relación directa entre la vía Wnt/ β catenina y el consumo crónico de cocaína. Es por esto que el objetivo general del presente trabajo de tesis es determinar el posible rol de la vía canónica de Wnt, y sus efectores, en las neuroadaptaciones desencadenadas por la exposición a cocaína, en un modelo animal de adicción como es la sensibilización comportamental. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluar si el desarrollo de sensibilización motora inducido por cocaína involucra modificaciones en los niveles de expresión de distintos efectores de la vía canónica de Wnt, como son la β catenina y la GSK3 β , en homogenados totales de áreas cerebrales pertenecientes al circuito de la motivación.
- 2) Examinar si la modificación en los efectores de la vía en los homogenados totales de los animales que desarrollaron la sensibilización se relaciona con la actividad de la vía canónica de Wnt. Para esto se realizará la determinación de los niveles de β catenina en subfracciones nucleares y de membrana, y se medirán los niveles de expresión del ARNm de diversos genes codifican de uno de los genes blanco de la vía, el de la Axina2; así como los factores Wnt.
- 3) Determinar la importancia de la modificación en los niveles del efector final de la vía, la β catenina, en el desarrollo de la sensibilización inducido por cocaína. Para ello, se propone:
 - a. Examinar los niveles de β catenina en aquellos animales que no desarrollaron la sensibilización comportamental a cocaína.

- b. Evaluar si el bloqueo del desarrollo de la sensibilización provocado por un pretratamiento sistémico con un activador de la vía (LiCl), está asociado con el restablecimiento de los niveles de β catenina, tanto en los homogenados totales como en las fracciones nucleares de las áreas del circuito de la motivación.
 - c. Analizar la importancia de la modificación en la actividad de la vía canónica de forma área específica. Para ello se trabajará con un pretratamiento que consistirá en la infusión intracerebral en distintas áreas de interés de una droga inhibidora de la vía canónica, el Sulindac.
- 4) Estudiar si la expresión de la sensibilización motora inducida por cocaína involucra modificaciones en los niveles de expresión de distintos efectores de la vía canónica de Wnt, como son la β catenina y la GSK3 β , en homogenados totales de las áreas cerebrales del circuito mesocorticolímbico.
- 5) Examinar si la modificación en los homogenados totales de alguno de los efectores en animales que expresaron la sensibilización, se relaciona con la actividad de la vía canónica de Wnt. Para esto lograr esto se realizará la determinación de los niveles de β catenina en subfracciones nucleares.
- 6) Determinar la importancia en la modificación de los efectores de la vía canónica para la expresión de la sensibilización. Para lograr esto, se evaluarán los niveles de β catenina en animales que desarrollaron la sensibilización y permanecieron un período sin contacto con la droga y en animales que no expresaron la sensibilización.
- 7) Evaluar si el bloqueo de la sensibilización con LiCl tiene efectos a largo plazo sobre la respuesta comportamental y la expresión de β catenina.



MATERIALES Y MÉTODOS

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos adultos de 250-350g, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR. Una semana antes de comenzar cualquier experimento, los animales fueron transportados a la sala de mantenimiento ubicada en el Laboratorio de Toxicología con el fin de proporcionar el tiempo necesario para la habituación al nuevo ambiente. La sala de mantenimiento se encuentra a una temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12h (7h/19h) donde las ratas permanecieron con acceso libre a alimento y agua. El uso y manejo de los animales se realizó de acuerdo al “Reglamento para el manejo y uso de animales de laboratorio” de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) que se encuentra basado en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (NIH, Instituto Nacional de Salud, EE.UU). Además el protocolo de investigación cuenta con la aprobación del Comité de Bioética en el Uso y Manejo de Animales de Laboratorio de la Facultad (Res N°557/2010).

Drogas

Los clorhidratos de cocaína y de ketamina (Laboratorios Saporiti, Buenos Aires, Argentina), la xilacina (Laboratorio Alfasan, Woerden, Holanda) y el ketorolac (Laboratorios Bernabó, Buenos Aires, Argentina) fueron disueltos en una solución de NaCl 0,9%P/V (solución fisiológica o salina). Mientras que, el cloruro de litio (LiCl) se preparó en agua MiliQ, y el Sulindac fue disuelto en una solución al 5% P/V de (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina. El LiCl, el Sulindac y la β -ciclodextrina fueron provistos por Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Aparato para medir actividad motora

Se utilizaron cajas de acrílico cuadradas (43x43x30 cm) equipadas con 8 pares de haces infrarrojos localizados a 3 cm del piso. La interrupción del haz de luz fue registrada automáticamente como una cuenta por medio de una computadora que está conectada a las cajas a través de un analizador. Luego, con la ayuda de un software adecuado se estimó la actividad locomotora total utilizando el número de cortes de haces. El registro se realizó en bloques de 10 min durante la hora de habituación previa a la inyección y durante las 2 hs posteriores a la misma. El sistema existente en nuestro

laboratorio fue diseñado y construido por investigadores del Laboratorio de Investigación Aplicada y Desarrollo, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (LIADE, Universidad Nacional de Córdoba).

Cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas guía bilaterales

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (85 mg/kg) y Xilazina (2.5 mg/kg) vía intraperitoneal [172], y colocados en un estereotáxico Kopf (David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA) cuya barra dental incisiva se ubicó a 3.3 mm por debajo de la línea interaural. Para implantar las cánulas guías bilaterales, el cráneo fue expuesto y se realizaron orificios con un torno de uso dental para posteriormente colocar y fijar las cánulas con cemento dental a una distancia de 1,5 mm por encima del sitio final de inyección. Los parámetros, tomados del Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson [173], fueron (en mm): anteroposterior (AP) +2.9, dorsolateral (DL) ± 0.5 , dorsoventral (DV) -2.0 para CPF; y, AP, -0.2, DL, ± 3.0 , y DV, -3.4 para ED. Las coordenadas AP y DL se tomaron desde bregma, mientras que la DV se tomó respecto de la superficie del cráneo. Junto con las cánulas guía se realizaron dos orificios adicionales superficiales, donde se colocaron dos pequeños tornillos con el fin de aumentar la sujeción del implante. Los animales recibieron una dosis diaria del analgésico antiinflamatorio no esteroide Ketorolac (2 mg/kg) vía intraperitoneal inmediatamente antes de la anestesia, así como durante los tres días posteriores a la cirugía. Todos los animales permanecieron en sus cajas hogar sin ser manipulados durante 1 semana para su completa recuperación [172].

Infusiones intracerebrales (IC)

Para realizar las infusiones IC de las drogas o vehículos, se trabajó con inyectores de 30 gauge, los cuales fueron insertados dentro de cada cánula guía (23 gauge) hasta alcanzar el sitio final de inyección. Los inyectores, se conectaron a una microjeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno, Nevada, EE.UU) de 10 μ l vía un catéter de polietileno (P10). Se administró un volumen de 1 μ l en un período de 180s utilizando una bomba de infusión (KDS 101, Kent Scientific Corporation, Torrington, Connecticut, EE.UU) luego de lo cual, el inyector permaneció dentro de la cánula guía por otros 60s para permitir la difusión completa de la solución.

Control del sitio final de inyección

Con el fin de corroborar el sitio de inyección IC, se realizó la fijación del tejido cerebral mediante perfusión transcardíaca. Para ello los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (85 mg/kg) y Xilazina (2,5 mg/kg), vía i.p.. Posteriormente se realizó la cateterización de la arteria aorta a través de la cual se procedió a perfundir en primer lugar solución fisiológica y luego una solución de formol 4% (solución fijadora) mediante la utilización de una bomba de perfusión (Masterflex L/S variable-speed modular drive, Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, EE.UU). Luego, el cerebro fue extraído y mantenido en la solución fijadora durante 24 a 48 hs para ser finalmente colocado en una solución de crioprotección (sacarosa al 30% en buffer fosfato 0,1M conteniendo azida al 0,01% P/V) a 4°C. Los cortes coronales de un grosor de 90 µm se obtuvieron con criostato y fueron observados directamente utilizando una lupa binocular estereoscópica. La localización incorrecta del sitio de inyección así como la presencia de tejido necrosado fue considerado razón suficiente para descartar al animal del estudio.

Obtención de muestras de tejido cerebral

Al finalizar aquellos experimentos en los que se recogerían muestras de tejido cerebral, los animales fueron rápidamente decapitados, sus cerebros fueron extraídos y disecados en una matriz de acrílico como fuera previamente descrito por Heffner y col [174]. En líneas generales se realizó la disección de NAcc, la CPF, el ED y la Amíg (Fig. 10). Sin embargo, de acuerdo al objetivo de cada experimento existieron pequeñas diferencias entre las áreas recolectadas y los tiempos de sacrificio. Estas diferencias se detallan más adelante. El material obtenido se almacenó a -80°C hasta su posterior procesamiento.

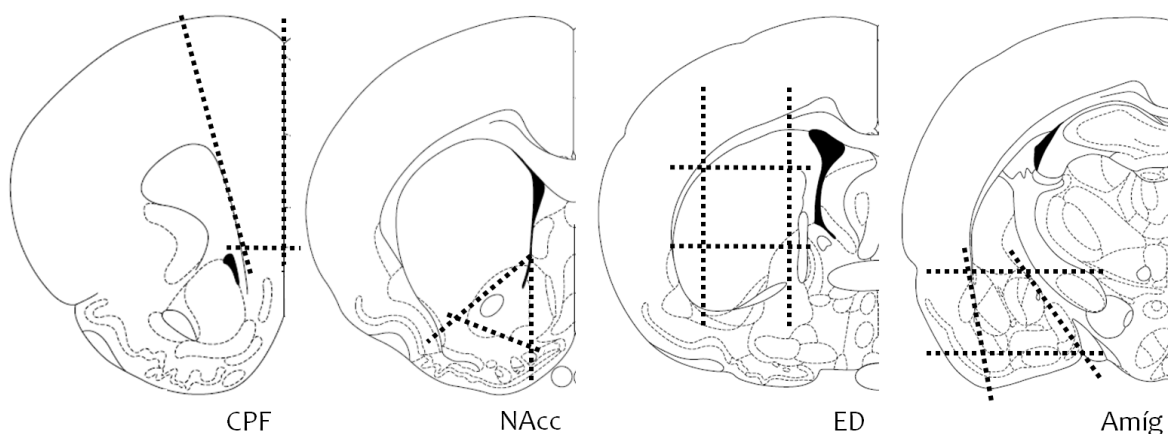


Figura 10: Diagrama coronales del cerebro de rata Las líneas de punto delimitan los cortes realizados para la obtención de las distintas áreas cerebrales: Corteza Prefrontal (CPF), Núcleo Accumbens (NAcc), Estriado Dorsal (ED) y Amígdala (Amíg). Adaptado de Paxinos y Watson [173].

ESTUDIOS COMPORTAMENTALES

Desarrollo de sensibilización inducida por psicoestimulantes

El protocolo de sensibilización usado fue descrito en la década del '80 por Kalivas y col [175] y ha sido ampliamente utilizado desde entonces. Para llevar a cabo este protocolo, ratas Wistar macho recibieron una inyección diaria de cocaína durante 7 días (2 x 15 mg/kg; 5 x 30 mg/kg, i.p.). Luego de la primera y la séptima inyección, cada una de 15 mg/kg i.p. de cocaína, se determinó la actividad motora durante las dos horas posteriores. Entre los días 2 a 6 los animales recibieron una inyección diaria de cocaína de 30 mg/kg i.p. en sus cajas hogar. Se consideró que se desarrolló sensibilización cuando la respuesta motora inducida por el tratamiento repetido con cocaína en el día 7 presentó al menos un 20% de aumento con respecto al día 1 [117], de esta forma los animales quedaron divididos entre sensibilizados (Repetido o Sens.) (incremento $\geq 20\%$) y no sensibilizados (No Sens.) (incremento $< 20\%$). En forma paralela se procesaron dos grupos controles: Salina, que recibió diariamente inyecciones de solución salina (1 ml/kg i.p.), y Cocaína Aguda, que recibió inyecciones de salina durante los 6 primeros días del tratamiento y el último día recibió una inyección de cocaína (15 mg/Kg i.p.). En estos grupos, también se registró la actividad motora durante la primera y la última inyección del tratamiento.

Expresión de sensibilización inducida por psicoestimulantes

Como ya fuera descripto, la expresión de la sensibilización es el resultado de los cambios neuroquímicos y moleculares inducidos por el tratamiento repetido con la droga, junto con un período durante el cual el animal permanece sin contacto con el psicoestimulante. Por lo tanto, para evaluar este fenómeno, ratas Wistar macho fueron sometidas al tratamiento repetido con cocaína descripto previamente (2 x 15mg/kg y 5 x 30mg/kg i.p.). Finalizadas las 7 inyecciones, permanecieron en sus cajas hogar por 21 días sin contacto con la droga. En el día 28 los animales recibieron un desafío con 15 mg/kg i.p. de cocaína luego del cual la actividad locomotora se registró durante dos horas. Así, se consideró que los animales expresaron la sensibilización cuando, en el día 28, la respuesta a cocaína era superior a la observada en el día 1. Los animales que no alcanzaron este criterio formaron parte del grupo No Sens. [117]. De forma simultánea se analizó el comportamiento de los siguientes grupos: Salina (desarrollo: salina, desafío: salina), Cocaína Aguda (desarrollo: salina, desafío: 15 mg/kg i.p. de cocaína) y Cocaína/Salina (Coc/Sal) (desarrollo: cocaína, desafío: salina). Al igual que el grupo tratado de forma repetida con cocaína, el registro de actividad se realizó los días 1, 7 y 28 (Fig. 11).

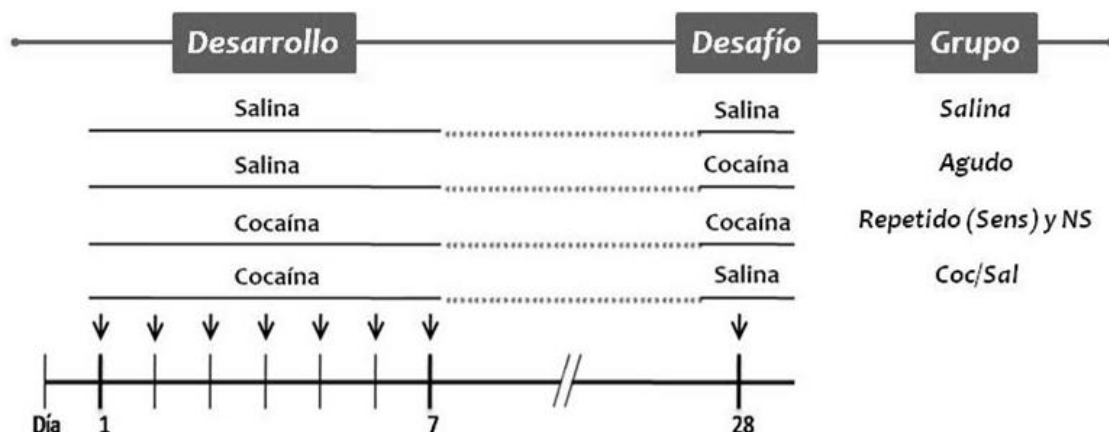


Figura 11: Esquemas de tratamiento utilizados durante la expresión de la sensibilización.

Pretratamiento con LiCl durante el desarrollo de la sensibilización inducida por cocaína

Para evaluar la importancia de los cambios en la vía canónica sobre el desarrollo de la sensibilización se realizó un pretratamiento con LiCl. Dado que, el LiCl actúa como un inhibidor inespecífico de la GSK3 β , esto es, se impide la fosforilación de

β catenina permitiendo que la misma se acumule y se transloque al núcleo para activar a sus genes diana. Así, los animales recibieron una inyección de LiCl (30 mg/kg i.p.) 30 minutos [169] antes de cada inyección de cocaína. En paralelo se procesaron los siguientes grupos controles: el grupo Salina/Salina (Sal/Sal) que recibió un pretratamiento con vehículo (solución salina, 1 mL/kg i.p.) previo a cada inyección de salina; el grupo LiCl/Salina (LiCl/Sal), que recibió una inyección de LiCl (30 mg/kg i.p.) previo a las inyecciones de salina y finalmente, el grupo Salina/Cocaína (Sal/Coc), que recibió una inyección de vehículo previo a cada inyección de cocaína (Fig. 12).

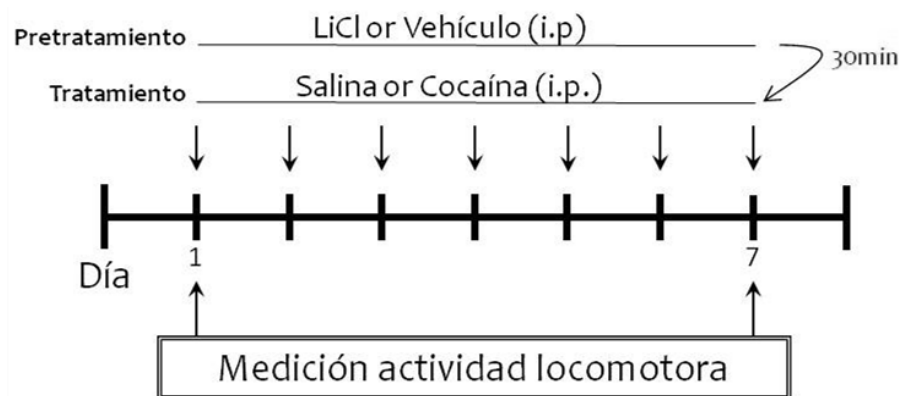


Figura 12: Esquema utilizado para el pretratamiento con LiCl durante el desarrollo de sensibilización a cocaína.

Infusiones intracerebrales de Sulindac en la CPF o el ED

Con el objetivo de determinar la importancia de los cambios en la vía en dos áreas específicas del circuito de la motivación, tales como CPF y el ED, durante el desarrollo de sensibilización conductual, se realizaron infusiones intra-cerebrales (IC) de un inhibidor farmacológico de la vía canónica: el Sulindac [176]. Para ello, una vez recuperados de la cirugía los animales recibieron los 15 mg/kg de cocaína en el día 1 y la actividad motora fue registrada durante las dos horas posteriores a la inyección. Luego, entre los días 2 y 6 los animales recibieron una infusión bilateral de Sulindac (5 μ g/lado) o vehículo ((2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) al 5%, 1 μ l/lado) en el área elegida una hora antes de recibir una inyección de cocaína de 15 mg/kg i.p. en sus cajas hogar. Finalmente en el día 7, al igual que el día 1, recibieron la inyección de cocaína (15 mg/kg i.p.) y se registró la actividad locomotora. Además se trabajó en paralelo con animales control que recibieron 7 inyecciones de solución salina (1 mL/kg i.p.) y el correspondiente pretratamiento con Sulindac o vehículo (Fig. 13).

Considerando que esperábamos que el pretratamiento con Sulindac facilitara el desarrollo de sensibilización, se utilizó una dosis de cocaína menor a la usada previamente (15 mg/kg incluso los 7 días) con el objetivo de permitir una mejor observación del cambio en el comportamiento asociado al efecto del pretratamiento.

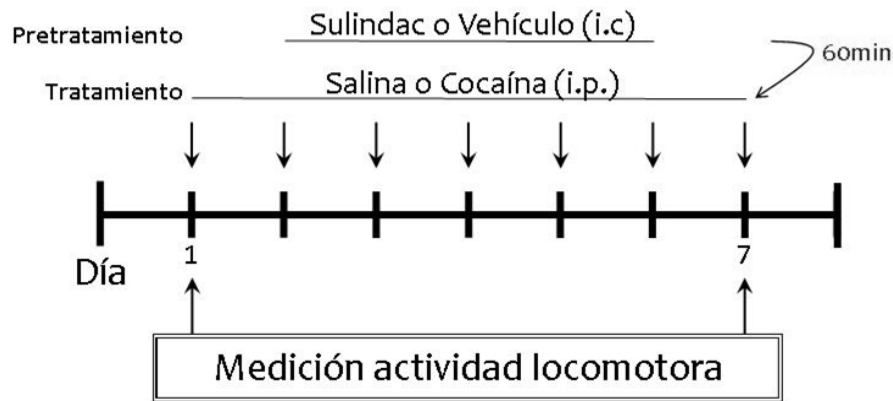


Figura 13: Esquema de administración usado para el pretratamiento con Sulindac IC

Evaluación de los efectos a largo plazo del pretratamiento con LiCl durante el desarrollo la sensibilización

Para establecer si el efecto del pretratamiento con LiCl durante el desarrollo de sensibilización a cocaína perduraba en el tiempo, un grupo diferente de animales recibió una inyección de LiCl (30 mg/Kg. i.p.) 30 min antes de cada inyección de cocaína (2 x 15 mg/kg i.p., 5 x 30mg/kg i.p.) o salina (7 x 1 ml/kg i.p.), y se evaluó las respuestas comportamentales del día 1 y 7. Luego, los animales permanecieron tres semanas en sus cajas hogar sin contacto con la droga. En el día 28, recibieron una última inyección de cocaína (15 mg/Kg i.p.) o salina (1 ml/kg i.p.), y nuevamente se evaluó la respuesta comportamental durante las dos horas posteriores a la inyección. En la Figura 14 se muestran los distintos esquemas de tratamiento usados.

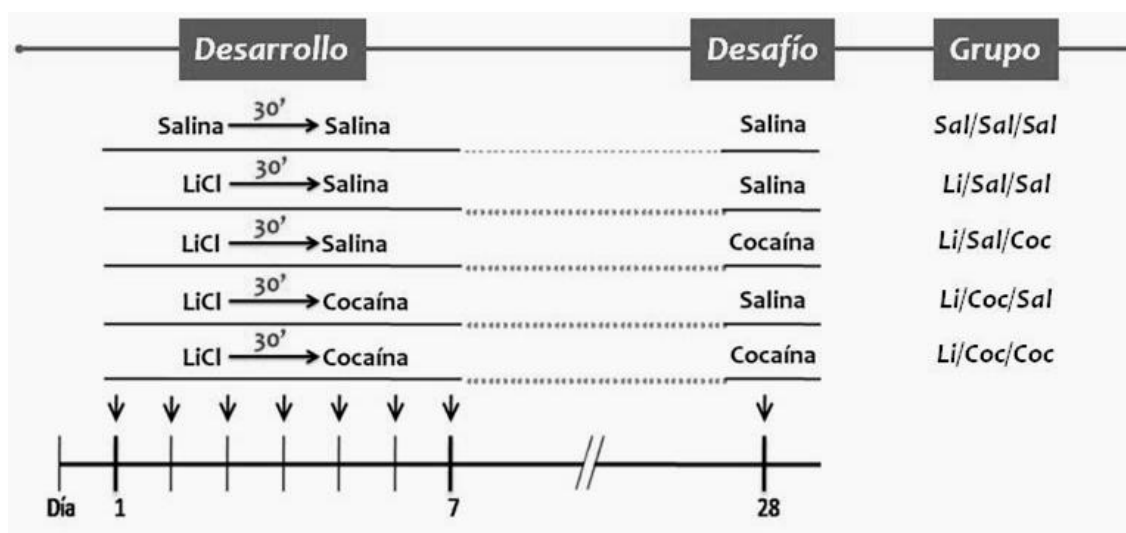


Figura 14: Esquemas de tratamiento utilizados para evaluar el efecto del pretratamiento con LiCl a largo plazo.

ESTUDIOS MOLECULARES

Procesamiento de muestras de tejido cerebral

Obtención de homogenados totales

Las áreas cerebrales fueron homogenizadas en buffer de lisis RIPA pH=8 (Tris-HCl 0,05M pH=7,5; NaCl 0,1M; EDTA 1mM; Tritón X-100 1 % V/V; SDS 0,1 % P/V deoxiglicolato de sodio 0,5%P/V) con inhibidores de fosfatasa (aprotinina 2 µg/mL; leupeptina 2 µg/mL; pepstatina 1 µg/mL; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µg/mL; Na₃VO₄ 1mM; NaF 50mM), y centrifugadas a 13000g por 5 minutos a 4°C. A partir del sobrenadante obtenido, se realizó la determinación de la concentración de proteínas totales por el método de Lowry [177] y posteriormente, las muestras se almacenaron con buffer LAEMMLY (Tris-HCL 0,05M pH=6,8, SDS 2%, glicerol 16%, β-mercaptoetanol 1.5M y Azul de Bromofenol) a -20°C hasta su posterior uso.

Fraccionamiento subcelular

Las áreas cerebrales fueron extraídas e inmediatamente homogenizadas (utilizando un homogenizador de teflón) en buffer sacarosa frío (sacarosa 0,32M, 10mM HEPES pH=7,4) con inhibidores de fosfatasa (aprotinina, leupeptina, pepstatina, PMSF, NaVO₃ y NaF) y centrifugadas a 1000g durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un segundo tubo y el pellet resuspendido en el buffer sacarosa y centrifugado a 1000g por 10 min. El sobrenadante se recogió en el segundo tubo y el

pellet se resuspendió en Buffer A (10mM HEPES pH=7,8, 10mM KCl) conteniendo inhibidores. Luego de centrifugar a 250g durante 10min, el pellet se lavó con Buffer A más IGEPAL 0,1% e inhibidores. A continuación, se incubó 10 min en hielo, se centrifugó a 250g 10 min y el pellet se resuspendió en Buffer RIPA con inhibidores, conformando la **fracción nuclear**. Las fracciones citosólica y de membrana se obtuvieron trabajando con el sobrenadante obtenido en los 2 primeros pasos. Éste se centrifugó a 1000g durante 6 min para separar los posibles restos nucleares (pellet) y el sobrenadante obtenido fue centrifugado nuevamente a 12000g por 20 min. A partir de aquí, se separó la **fracción citosólica** (sobrenadante) y el pellet se lavó dos veces con Buffer HEPES/EDTA (4mM HEPES pH=7,4, 1mM EDTA) conteniendo inhibidores, se centrifugó (12000g, 10 min) y resuspendió en Buffer RIPA con inhibidores, obteniéndose la **fracción de membrana**. Durante todo el procedimiento, las muestras fueron mantenidas a 4°C. La determinación de la concentración de proteínas en cada fracción se realizó por el método de Lowry [177] y posteriormente, las muestras se almacenaron con buffer LAEMMLY hasta su utilización. La Figura 16 muestra el esquema del procedimiento experimental utilizado. Una vez obtenidas las 3 fracciones subcelulares se procedió a caracterizar el contenido proteico de cada fracción para evaluar la eficiencia del protocolo de fraccionamiento empleado. La pureza de la fracción nuclear se corroboró por la ausencia de tubulina mientras que la pureza de la fracción de membrana se confirmó por el incremento de la proteína PSD-95 respecto al homogenados total (Fig. 15).

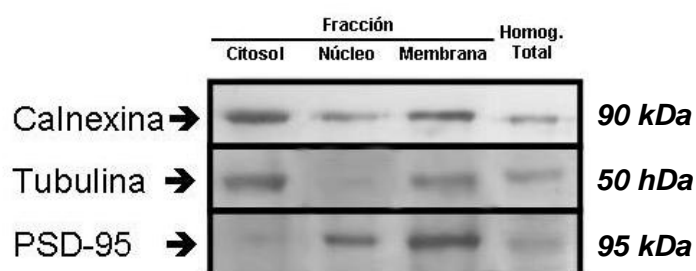


Figura 15: Caracterización del contenido proteico de cada fracción subcelular a través de la técnica de western blot.

toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (anti- β catenina 1:10000, anti-phospho-GSK3 β -Y216 1:8000, anti-GSK3 β -total 1:10000; BD BioScience, San José, California, EEUU). A continuación las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa alcalina (anti-mouse 1:7000 o anti-rabbit 1:10000; Sigma, St. Louis, MO, EEUU), para finalmente ser reveladas por quimioluminiscencia (ECL). La semicuantificación se realizó usando el programa Gel-Pro Plus. En los casos correspondientes el contenido de tubulina (1:14000; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) o GSK3 β -total (1:10000; BD BioScience, San José, California, EEUU) fue utilizado como control de carga del gel.

Extracción del ARN mensajero (ARNm) y RT-PCR.

El ARNm de las áreas cerebrales disecadas se extrajo con TRIzol® (Invotrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADNc se sintetizó mezclando 0,5 μ g de primers de oligodT (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), 2 μ g del ARNm obtenido a partir de la extracción con TRIzol®, 5 μ l de buffer-RT (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), 0.5 mM de los cuatro desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTPs, Promega, Madison, Wisconsin, EEUU) con 200 unidades de la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU) durante 60 min a 37°C. Posteriormente se realizó la PCR utilizando 3 μ l del ADNc obtenido, la enzima GoTaq ADN polimerasa (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), dNTPs, y los primers específicos. Estos últimos fueron diseñados utilizando el programa Primer3 free software [179] y se muestran en la tabla 1. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 2 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguida por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de *annealing* a 62°C y 45 segundos de extensión a 72°C; y, finalizados los ciclos, 5 minutos a 72°C para la extensión final.

Gen	Directo	Reverso
Axin2	5-TTTGGAGGAATGGTCTCTCG-3	5-CTTGAGGTGCATGTGACTGG-3
Wnt 3a	5-TTTGGAGGAATGGTCTCTCG-3	5-CTTGAGGTGCATGTGACTGG-3
Wnt 5a	5-TCGACTATGGCTACCGCTTC-3	5-CGACCTGCTTCATTGTTGTG-3
Wnt 7a	5-CCCGAACCCTCATGAACTTA-3	5-TGTGGTCCAGCACGTCTTAG-3
Wnt 7b	5-AGCCAACATCATCTGCAACA-3	5-GGCATTCATCGATACCCATC-3
Wnt 8b	5-TCCCGAGCTTGGTTTAGAGA-3	5-AATCCGGAAAGTGTCACCTCG-3
18S	5-CGCTAGAGGTGAAATTCTTGG-3	5-CGGAACCTACGACGGTATCTGA-3

Tabla 1: Secuencia de los distintos primers utilizados para la técnica de PCR

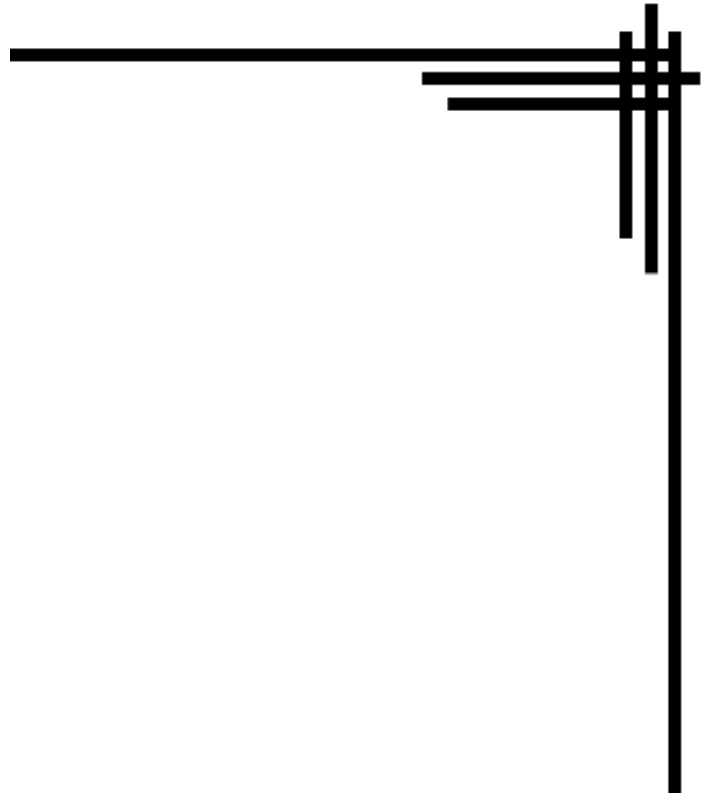
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos de la conducta de los animales tratados con salina o cocaína (de forma aguda o repetida) fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 6 y mediante una ANOVA de dos vías para medidas repetidas, utilizando Bonferroni como análisis *post hoc*.

El análisis estadístico de las pruebas conductuales para aquellos grupos que recibieron un pretratamiento i.p. (con LiCl o vehículo) o IC (con Sulindac o vehículo), fue realizado con el Software SPSS. Para ello se utilizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas para las determinaciones durante el desarrollo de la sensibilización, siendo los factores de consideración: tratamiento (administración repetida de cocaína o salina); pretratamiento (administración de LiCl o de Sulindac o de vehículo) y tiempo (días 1 y 7, siendo este último el factor analizado como medidas repetidas). En el caso de la expresión, se aplicó un ANOVA de 3 vías para medidas repetidas siendo los factores en consideración: tratamiento (administración repetida de cocaína o salina); pretratamiento (administración de LiCl o salina), desafío (salina o cocaína) y tiempo (días 1, 7, y 28 siendo este último el factor analizado como medidas repetidas). En ambos casos el *test post hoc* utilizado fue el de Bonferroni o LSD.

Para las determinaciones bioquímicas también se utilizó el programa GraphPad Prism 6 para los resultados obtenidos que se analizaron mediante pruebas de ANOVA de una o de dos vías según correspondiera, con Bonferroni como análisis *post hoc*. Para el caso de la utilización del análisis de ANOVA de tres vías, se utilizó el Software SPSS y al LSD como análisis *post hoc*. En aquellos casos en los se comparan datos pertenecientes solo a dos grupos experimentales se utilizó la *t-student*.

Se consideró diferencia significativa cuando el valor de p fue menor a 0,05. Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar medio (EEM).



RESULTADOS

DESARROLLO DE SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA

Evaluación de la actividad de la vía canónica de Wnt durante el desarrollo de la sensibilización comportamental a cocaína

Estudios comportamentales

El protocolo utilizado en el presente trabajo de tesis fue desarrollado por Kalivas y col [175] y produce desarrollo de sensibilización motora en alrededor del 60% del total de los animales tratados [117, 136, 180]. Es decir, alrededor del 60% de los animales muestran un aumento de la actividad locomotora en el día 7 de al menos un 20% respecto del primer día del tratamiento [117]. En la Figura 17 se muestran los resultados comportamentales de ratas sacrificadas a 3 o 24 hs luego de la última inyección (Fig. 17A y B, respectivamente) para animales que fueron tratados de forma repetida con cocaína y desarrollaron la sensibilización comportamental y para animales tratados con salina o con cocaína aguda.

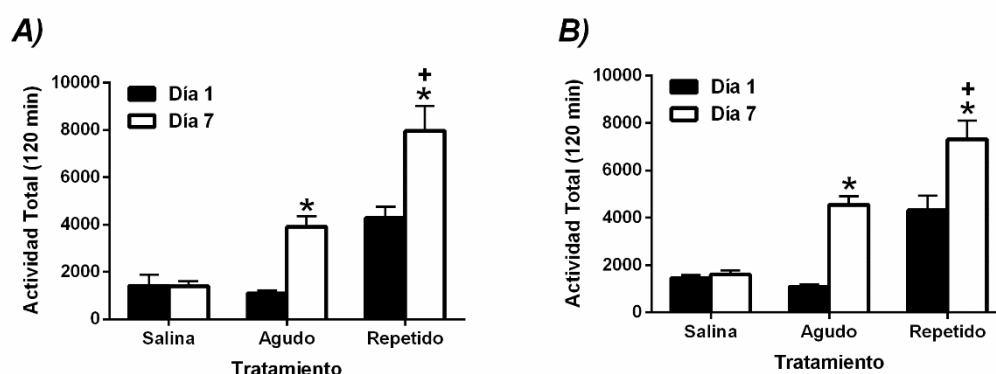


Figura 17: Desarrollo de sensibilización motora inducido por el tratamiento repetido con cocaína. Los gráficos de barras muestran la actividad motora total registrada durante las 2hs posteriores a la inyección en el día 1 y en el día 7 de animales sacrificados 3 hs (A) o 24 hs (B) luego de la última inyección del tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *Significativamente diferente del día 1 del tratamiento correspondiente, $p < 0,01$. + Significativamente diferente del día 7 del Agudo, $p < 0,01$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni ($n=8-10$ por grupo).

Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas aplicado a los resultados recogidos para la actividad locomotora total de animales sacrificados a 3 hs (Fig. 17A), reveló un efecto significativo del factor tratamiento [$F(2,21)= 31,40$, $p < 0,0001$], y tiempo [$F(1,21)= 31,94$, $p < 0,0001$], así como de la interacción tratamiento x tiempo

[F(2,21)= 5,548, $p=0,0019$]. El análisis post hoc de Bonferroni de estos datos reveló que el tanto el grupo agudo como el repetido presentaron diferencias significativas en la comparación de la actividad motora entre los Días 1 y 7; siendo el Día 7 del grupo repetido significativamente diferente al del agudo. De igual manera, un ANOVA de 2 vías para medidas repetidas aplicado a los datos comportamentales de animales sacrificados a 24 hs, mostrados en la Figura 17B, reveló un efecto significativo del factor tratamiento [F(2,23)= 33,78, $p<0,0001$], y tiempo [F(1,23)= 120,6, $p<0,0001$], así como de la interacción tratamiento x tiempo [F(2,23)= 28,73, $p<0,0001$]. El análisis post hoc de Bonferroni de estos datos reveló que el tanto el grupo agudo como el repetido presentaron diferencias significativas en la comparación de la actividad motora entre los Días 1 y 7; siendo el Día 7 del grupo repetido significativamente diferente al del agudo. Tal como había sido previamente observado en otros laboratorios, estos resultados muestran que el protocolo utilizado induce el desarrollo de sensibilización motora a cocaína.

Estudios moleculares

Determinación de los niveles de β catenina durante el desarrollo de la sensibilización comportamental a cocaína

Una vez finalizada la evaluación comportamental, se procedió a evaluar el estado de la vía canónica de Wnt utilizando como indicador los niveles de la proteína efectora final de la vía, la β catenina. El análisis de los niveles totales de β catenina se realizó en homogenados totales de diferentes áreas del circuito de motivación (CPF, NAcc, ED y Amíg) extraídas de los animales sacrificados a 3hs (Fig. 18) o a 24 hs (Fig. 19) luego de la última inyección del tratamiento. En todos los casos, los animales incluidos en el grupo Repetido fueron aquellos que desarrollaron la sensibilización comportamental a la cocaína.

El análisis de ANOVA de una vía aplicado a los niveles totales de β catenina en los animales sacrificados 3 hs luego de la última inyección (Fig. 18) mostró un efecto significativo del factor tratamiento en la CPF y el ED (Fig. 18 A y B) [**CPF**: F(2,18)= 3,702, $p=0,045$; **ED**: F(2,19)= 29,12, $p<0,0001$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni reveló una disminución estadísticamente significativa en los niveles de β catenina en los animales que recibieron el tratamiento repetido respecto al grupos Salina en la CPF y el

ED. Además, en el ED el grupo que recibió el tratamiento agudo también presentó una diferencia significativa con respecto al grupo Salina.

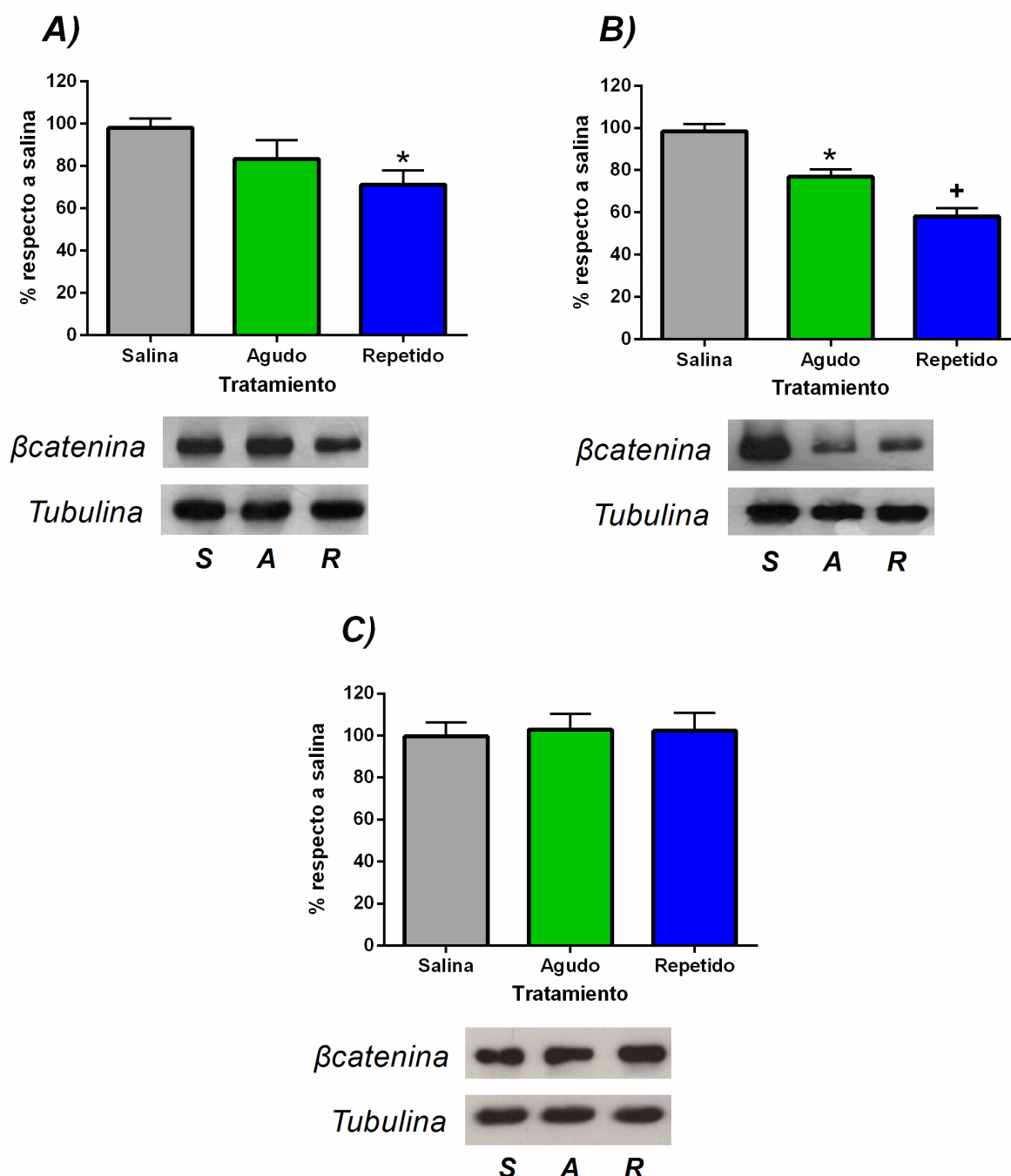


Figura 18: Niveles de β catenina durante el desarrollo de sensibilización a cocaína. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en homogenados totales de la CPF (A), el ED (B) y el NAcc (C) de animales que desarrollaron sensibilización (cocaína repetida) o sus controles (Salina y Cocaína Aguda) y fueron sacrificados 3 hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de Salina, $p < 0.05$; ⁺Significativamente diferente del resto de los grupos, $p < 0.05$. ANOVA de una vía, post test Bonferroni ($n = 7-8$ por grupo).

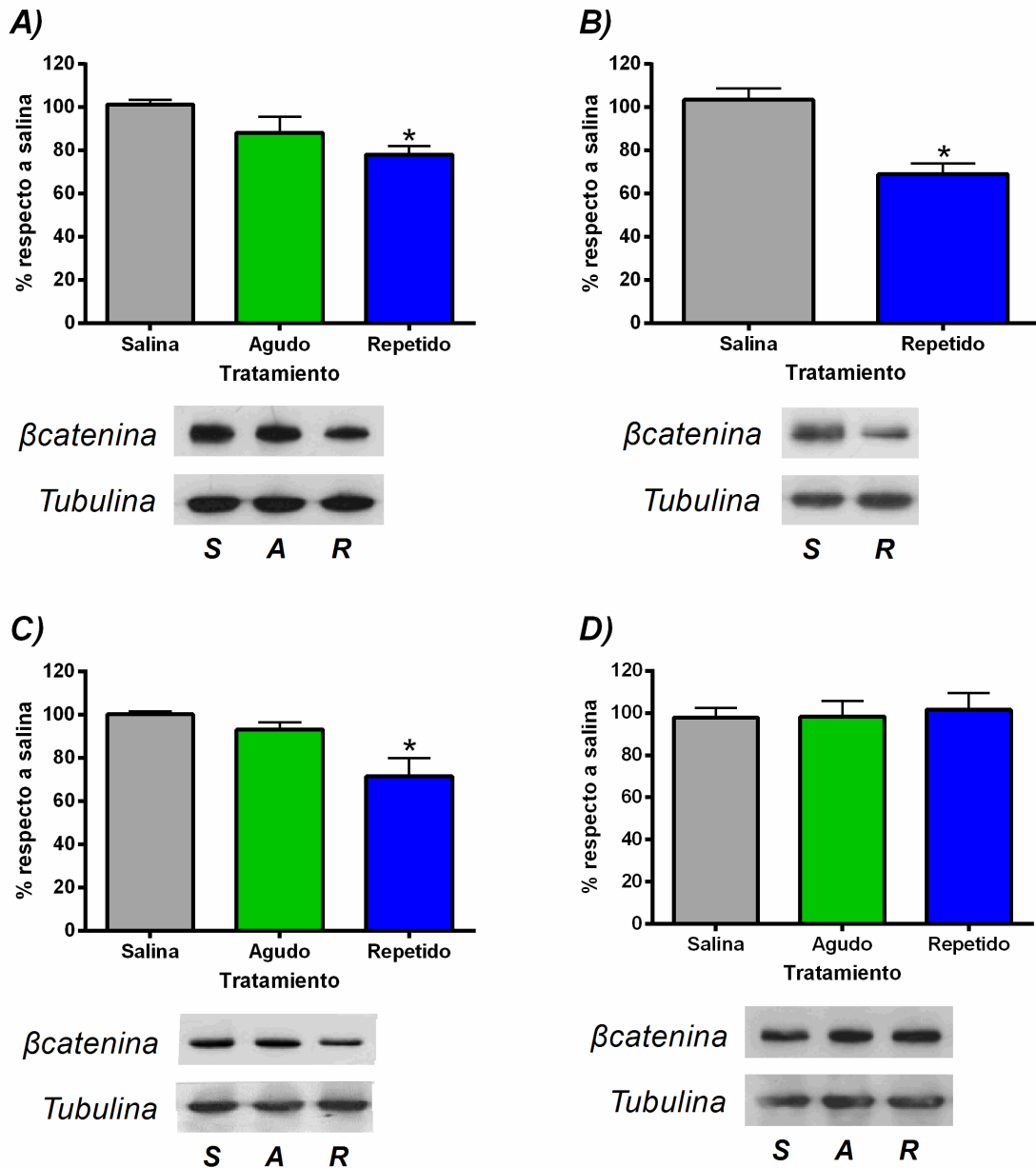


Figura 19: Niveles de β catenina durante el desarrollo de sensibilización a cocaína. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en homogenados totales de la CPF (A), la Amí (B), el ED (C) y el NAcc (D) de animales que desarrollaron sensibilización (cocaína repetida) o sus controles (Salina y cocaína aguda) y fueron sacrificados 24 hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de Salina, $p < 0.01$; ANOVA de una vía, post test Bonferroni (A, C y D) y t test (B) ($n = 7-10$ por grupo).

Respecto a los resultados obtenidos para animales sacrificados 24 hs luego de la última inyección, la evaluación estadística de los niveles de β catenina (Fig. 19) reveló un efecto significativo del factor tratamiento en la CPF y el ED (Fig. 19 A y C) [CPF: $F(2,20) = 6,013$, $p = 0,009$; ED: $F(2,19) = 8,175$, $p = 0,0027$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni reveló diferencias significativas entre el grupo con tratamiento repetido y el

grupo Salina tanto en la CPF como en el ED. La comparación de los niveles totales de β catenina en la Amíg (Fig. 19 B) mostró una diferencia significativa entre el grupo Salina y el grupo con tratamiento repetido (*t test*, $p=0,0003$).

En conjunto, estos resultados indicarían que el desarrollo de sensibilización está relacionado con una disminución en los niveles del efector final de la vía canónica de Wnt, β catenina, en áreas del circuito de la motivación como son la CPF, el ED y la Amíg.

Determinación de la actividad de GSK3 β durante el desarrollo de la sensibilización a cocaína

Como fuera mencionado en la introducción, los niveles de β catenina están altamente regulados a través de la actividad de un complejo de degradación que involucra, entre otras, a la quinasa GSK3 β . Esta proteína posee dos sitios de fosforilación específicos ubicados en la serina 9 (sitio de inhibición) y en la tirosina 216 (sitio de activación) [181]. En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la actividad de la quinasa GSK3 β a través de la determinación de los niveles fosforilación en la tirosina 216 en animales que desarrollaron sensibilización comportamental a cocaína y fueron sacrificados 24 hs luego de la última inyección. La comparación simple de estos datos indicó que tanto en la CPF (*t test*, $p=0,0105$), la Amíg (*t test*, $p=0,0229$) como en el ED (*t test*, $p=0,0006$) la actividad de la GSK3 β se encuentra significativamente incrementada en los homogenados totales de los animales que desarrollaron la sensibilización a cocaína respecto del grupo Salina. Estos resultados indicarían que sería la activación de ésta proteína la responsable de la disminución observada en los niveles totales de β catenina.

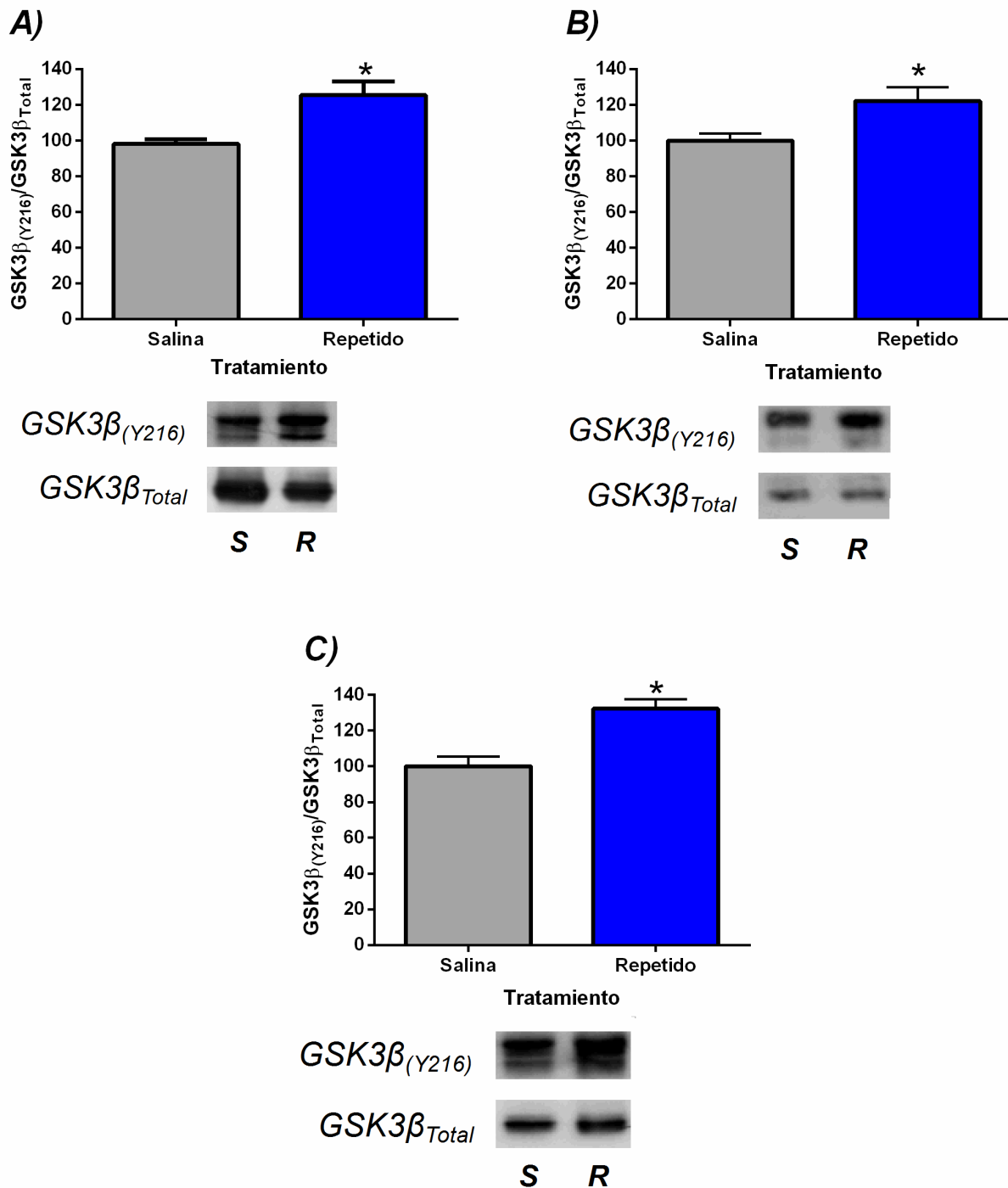


Figura 20: Niveles de GSK3 β activa en el desarrollo de sensibilización a cocaína. Los gráficos de barras muestran los niveles de actividad de GSK3 β en homogenados totales de la CPF (A), la Amíg (B) y el ED (C) de animales que fueron tratados con salina o desarrollaron sensibilización a cocaína y fueron sacrificados 24hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de Salina, $p < 0.05$, t test ($n = 7-10$ por grupo).

Determinación de los niveles de β catenina en fracciones subcelulares de animales que desarrollaron sensibilización a cocaína

Con el fin de determinar si los cambios observados en los niveles de β catenina en los homogenados totales durante el desarrollo de la sensibilización están relacionados con la vía canónica de Wnt, se evaluó el contenido de este efector en la fracción nuclear de la CPF (Fig 21 A) y del ED (Fig. 21 B). Esta determinación se realizó dado que en la vía canónica la unión de Wnt a su receptor Fz da lugar a la activación de Dvl resultando en la inhibición de GSK3 β , la estabilización de β catenina y su posterior pasaje al núcleo.

El análisis estadístico de los datos de la Figura 21 a través de una comparación simple indicó que los animales que desarrollaron sensibilización muestran niveles significativamente disminuidos de β catenina en la CPF (*t test*, $p=0,0365$), mientras que no se observan cambios en el ED.

Considerando que la β catenina, además de actuar como efector de la vía canónica de Wnt, participa en las uniones de adhesión, se determinaron los niveles de esta proteína durante el desarrollo de la sensibilización en la fracción de membrana de la CPF (Fig 21 C). Los resultados indicaron que los animales que desarrollaron la sensibilización no presentan modificaciones en los niveles de membrana de β catenina; lo cual podría ser explicado por el hecho de que la reserva de β catenina presente en la membrana sería diferente a la nuclear, que es la regulada por la vía de señalización de los factores Wnt [159].

En conjunto estos resultados indicarían que el desarrollo de sensibilización comportamental a cocaína estaría asociado con una inhibición de la vía canónica de Wnt en la CPF. En tanto que en el ED no se observaron modificaciones en los niveles del efector final en la fracción nuclear, con lo que la disminución observada en los homogenados totales podría no estar relacionada con modificaciones en la actividad de la vía canónica.

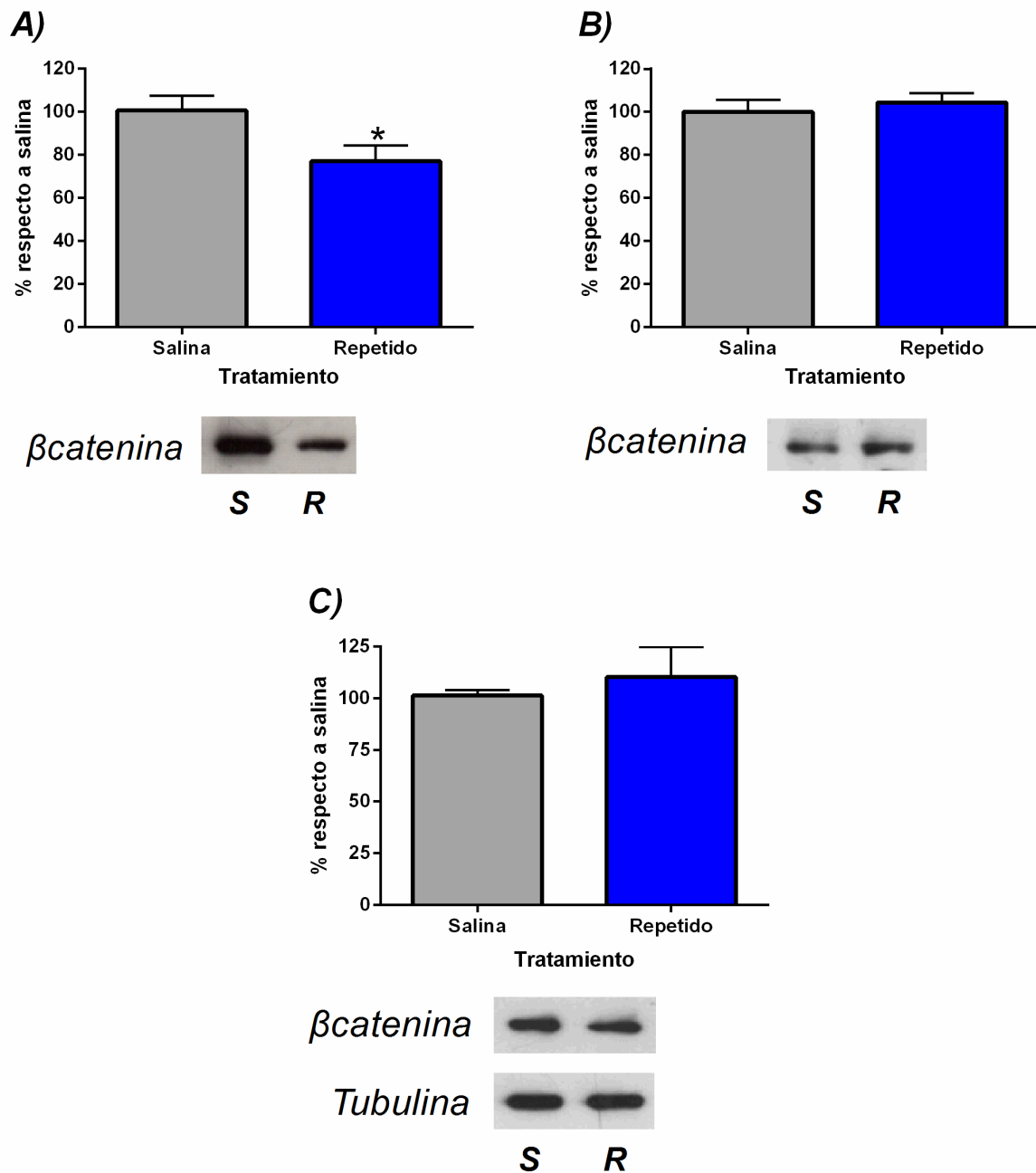


Figura 21: Niveles de β catenina en subfracciones celulares durante el desarrollo de sensibilización a cocaína. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en las fracciones nucleares de la CPF (A) y el ED (B), y en la fracción de membrana de la CPF (C) de animales que fueron tratados con salina o desarrollaron sensibilización a cocaína y fueron sacrificados 24hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de Salina, $p < 0.05$, t test ($n = 6-9$ por grupo).

Determinación de los niveles de expresión del ARNm de genes relacionados con las vías del Wnt durante el desarrollo de la sensibilización a cocaína

Debido a que los animales que desarrollan sensibilización a cocaína presentan modificaciones que indicarían una inhibición de la vía canónica de Wnt en la CPF, se examinó la expresión del ARNm de diferentes factores Wnt así como del gen de *Axina 2*, cuya expresión es considerada un indicador de la actividad de la vía canónica [162]. Tal como muestra la Figura 22, el desarrollo de sensibilización produciría una disminución significativa en la expresión del ARNm de *Wnt7b* (Fig. 22A) (*t test*, $p=0,0199$) y de *Axina2* (Fig. 22 B) (*Mann-Whitney test*, $p=0,0055$) en la CPF de animales sacrificados 24 hs luego de la última inyección. Estos resultados indicarían que el desarrollo de sensibilización estaría asociado a una disminución en la actividad de la vía Wnt/ β catenina en la CPF, que podría deberse a una disminución en los niveles de *Wnt7b*.

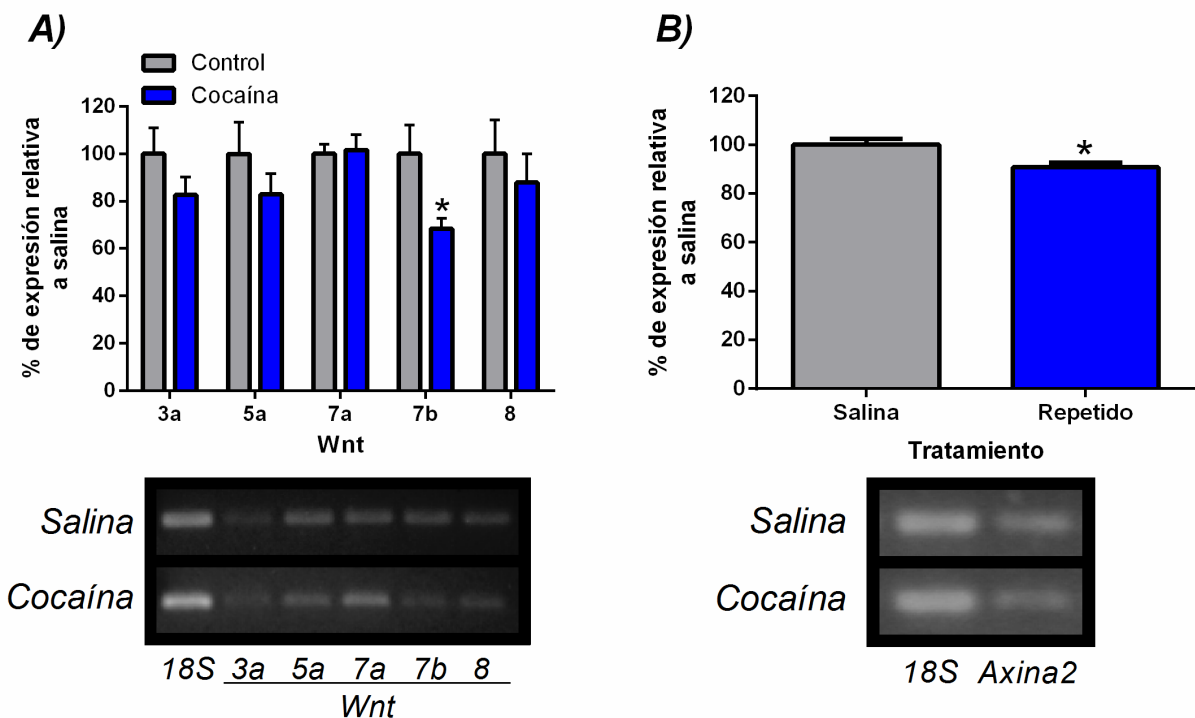


Figura 22: Niveles de expresión de factores Wnt y Axina2 durante el desarrollo de sensibilización a cocaína. Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión de ARNm de diferentes factores Wnt (A) y del gen Axina2 (B) en la CPF de animales que fueron tratados con salina o desarrollaron sensibilización a cocaína y fueron sacrificados a las 24hs. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de Salina, $p<0.05$, *t test* (A) y *Mann-Whitney test* (B) ($n=5-9$ por grupo).

Determinación de los niveles de β catenina en animales que no desarrollaron la sensibilización comportamental a cocaína

Estudios comportamentales

Tal como fuera previamente documentado en diversos trabajos donde se utilizó el mismo esquema de tratamiento [117, 136, 180], aproximadamente el 40% de los animales tratados no mostró el aumento de actividad locomotora asociado a la sensibilización a cocaína. En la Figura 23 se muestran los resultados de este grupo de animales no sensibilizados, seleccionados utilizando el criterio propuesto por Pierce y col. [117].

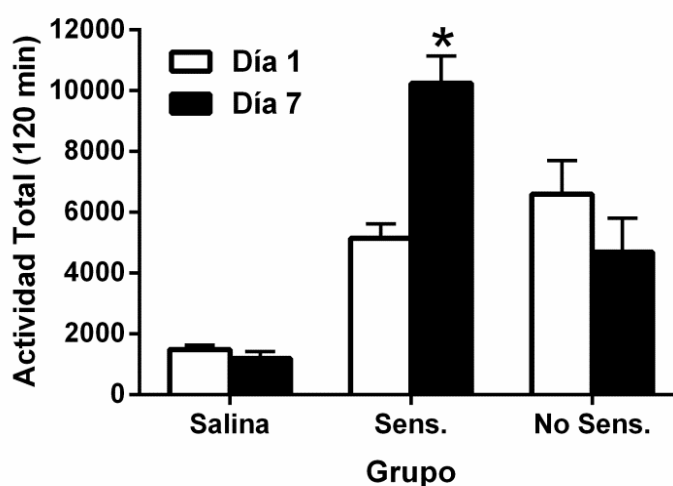


Figura 23: Actividad locomotora total en los Días 1 y 7. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de la actividad motora total registrada durante las 2 horas posteriores a la inyección de cocaína o salina. *Significativamente diferente del resto de los grupos, $p < 0.05$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni ($n = 8 - 10$ por grupo).

En la Figura 23 se muestra la respuesta motora promedio observada para cada uno de los grupos. Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas aplicado a los datos mostrados en la figura revelaron un efecto significativo del grupo (sensibilizados, no sensibilizados o Salina) [$F(2,23) = 32,29$, $p < 0,0001$], y del tiempo [$F(1,23) = 9,275$, $p = 0,0057$], así como una interacción significativa grupo \times tiempo [$F(2,23) = 34,85$, $p < 0,0001$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni de estos datos reveló que el grupo sensibilizado presentó diferencias significativas en la actividad motora del día 7 respecto del resto de los días en todos los grupos.

Estudios moleculares

Determinación de los niveles de β catenina en animales que no desarrollaron la sensibilización comportamental a cocaína

La evaluación de la actividad de la vía canónica de Wnt en áreas cerebrales pertenecientes al circuito de la motivación mostró diferencias significativas en aquellos animales que desarrollaron la sensibilización a cocaína. Sin embargo, y tal como se muestra en la Figura 23, un porcentaje de las ratas tratadas no mostró el aumento de actividad locomotora asociado a la sensibilización a cocaína. Con el fin de esclarecer aún más la importancia que la modificación en la actividad de la vía canónica tiene para el desarrollo de sensibilización comportamental, se evaluaron los niveles de β catenina en homogenados totales obtenidos a partir de este grupo de animales no sensibilizados (Fig. 24).

La evaluación estadística de los datos representados en la Figura 24 reveló un efecto significativo del grupo (sensibilizados, no sensibilizados o Salina) en la CPF [$F(2,15)= 15,51$, $p=0,0002$] (Fig. 24 A), en la Amig [$F(2,18)= 14,97$, $p=0,0001$] (Fig. 24 B) y en el ED [$F(2,16)= 18,26$, $p< 0,0001$] (Fig. 24 C). En tanto que, el análisis *post hoc* de Bonferroni mostró que en todos los casos el grupo sensibilizado presentó diferencias significativas con el grupo Salina y el no sensibilizado. Particularmente en la Amig el grupo no sensibilizado presentó, también, diferencias significativas en comparación con el grupo Salina. Estos resultados indicarían que la disminución observada en los niveles de β catenina en las áreas evaluadas estaría directamente relacionada con el desarrollo de sensibilización comportamental, y no sería solamente una respuesta provocada por el tratamiento repetido con cocaína.

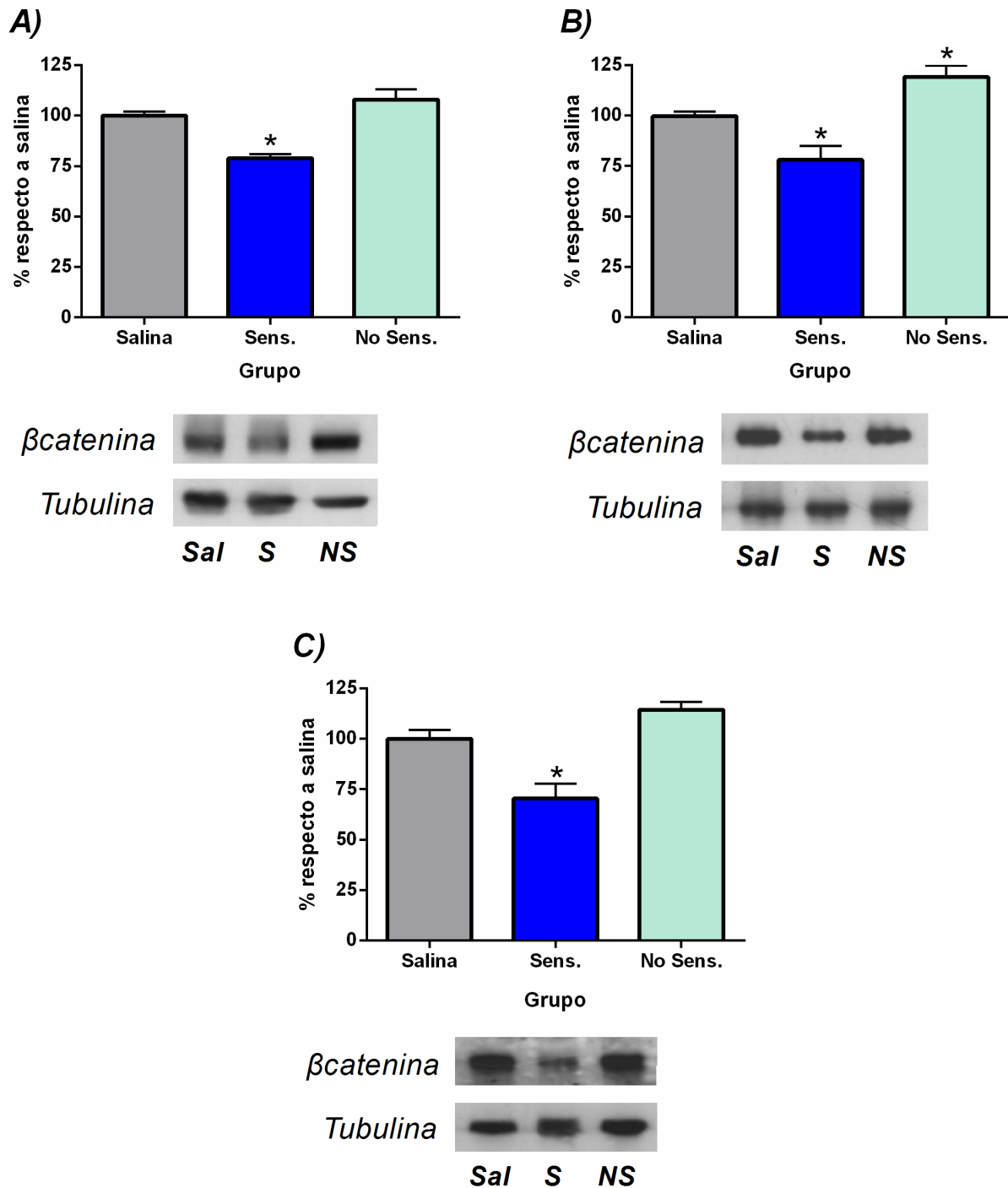


Figura 24: Niveles de β catenina en animales tratados de forma repetida con cocaína. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en homogenados totales de CPF (A), la Amíg. (B) y el ED (C) de animales que fueron tratados con salina o cocaína y desarrollaron sensibilización comportamental (Sens.) o no (No Sens.). Todos fueron sacrificados 24hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de los otros grupos analizados $p < 0.05$. ANOVA de una vía, post test Bonferroni. ($n = 5-8$ por grupo).

Evaluación del efecto de la activación sistémica de la vía de Wnt en el desarrollo de la sensibilización motora inducida por cocaína

Se ha demostrado que el LiCl es un inhibidor de la quinasa GSK3 β y, que por lo tanto, funciona como un imitador de los factores Wnt, activando la vía canónica [182, 183]. Es por esto que, para evaluar la importancia en la disminución de los niveles de β catenina durante el desarrollo de la sensibilización, se trabajó administrando LiCl de sistémica. Para ello los animales recibieron una inyección de LiCl (30 mg/kg i.p.) 30 minutos antes de cada inyección de salina o cocaína. La actividad motora se registró, después de las inyecciones, en los días 1 y 7 (Fig. 25) y los niveles de β catenina se evaluaron en homogenados totales y en fracciones subcelulares de áreas obtenidas a partir de animales sacrificados 24 hs luego de la última inyección (Fig. 26 y 27).

Estudios comportamentales

La Figura 25 muestra los resultados comportamentales obtenidos para los distintos grupos de animales tratados

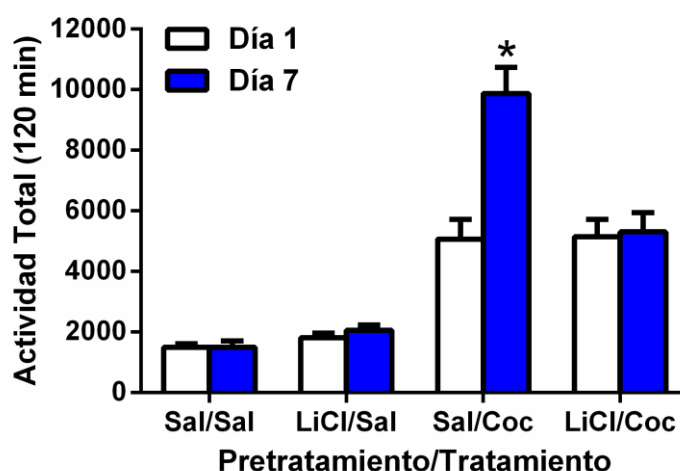


Figura 25: El LiCl bloquea el desarrollo de sensibilización motora inducido por cocaína. El gráfico de barras muestra la actividad motora total registrada durante las 2hs posteriores a la inyección en el día 1 y en el día 7. Las barras representan la media \pm EEM. *Significativamente diferente del día 1 de Sal/Coc y, de los días 1 y 7 del resto de los grupos, $p < 0.05$. ANOVA de dos vías para medidas repetidas, post test Bonferroni. ($n=8-13$ por grupo).

Un ANOVA de 2 vías para medidas repetidas aplicado sobre los datos de la Figura 25, reveló un efecto significativo del factor tratamiento [$F(1,40) = 119,53$, $p < 0,0001$], así como interacciones significativas entre pretratamiento x tratamiento [F

(1,40)= 7,59, $p=0,01$] y pretratamiento x tratamiento x tiempo [$F(1,40)= 13,29$, $p<0,001$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que el grupo Sal/Coc presentó diferencias significativas en la comparación de la actividad motora del día 7 con en su respectivo día 1 y, con los días 1 y 7 del resto de los grupos. Estos resultados indicarían que el pretratamiento con LiCl es suficiente para bloquear el desarrollo de la sensibilización comportamental a cocaína.

Estudios moleculares

Determinación de los niveles de β catenina en animales pretratados con LiCl: homogenados totales

La Figura 26 muestra los resultados obtenidos para los niveles de β catenina en los homogenados totales de las distintas áreas extraídas para los distintos grupos tratados. Un ANOVA de dos vías aplicado a los datos de la Figura 26 mostró en la CPF (Fig. 26 A) un efecto significativo del factor pretratamiento [$F(1,32)= 20,10$, $p<0,0001$], y tratamiento [$F(1,32)= 13,13$, $p=0,0010$], así como de la interacción tratamiento x pretratamiento [$F(1,32)= 26,77$, $p<0,0001$]. En tanto que, el análisis *post hoc* de Bonferroni indicó una diferencia significativa del grupo Sal/Coc en relación al resto de los tratamientos. En la Amíg. (Fig. 26 B) el análisis de ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del factor pretratamiento [$F(1,33)= 11,46$, $p=0,0019$], y tratamiento [$F(1,33)= 13,35$, $p=0,0009$], así como de la interacción tratamiento x pretratamiento [$F(1,33)= 9,245$, $p=0,0046$]. Mientras que el análisis *post hoc* de Bonferroni mostró una diferencia significativa entre los animales Sal/Coc y el resto de los grupos evaluados. Respecto al ED (Fig. 26 C), el ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo del factor pretratamiento [$F(1,31)= 11,07$, $p=0,0023$], y tratamiento [$F(1,31)= 13,89$, $p=0,0008$]; y, el análisis *post hoc* de Bonferroni reveló una diferencia significativa del grupo Sal/Coc respecto del resto de los tratamientos aplicados. Finalmente, en el NAcc (Fig. 26 D) el ANOVA de dos vías indicó un efecto del pretratamiento [$F(1,36)= 21,66$, $p<0,0001$] y el análisis *post hoc* de Bonferroni permitió revelar una diferencia significativa de los grupos que recibieron el pretratamiento con LiCl (LiCl/Sal y LiCl/Coc) con respecto al grupo control (Sal/Sal).

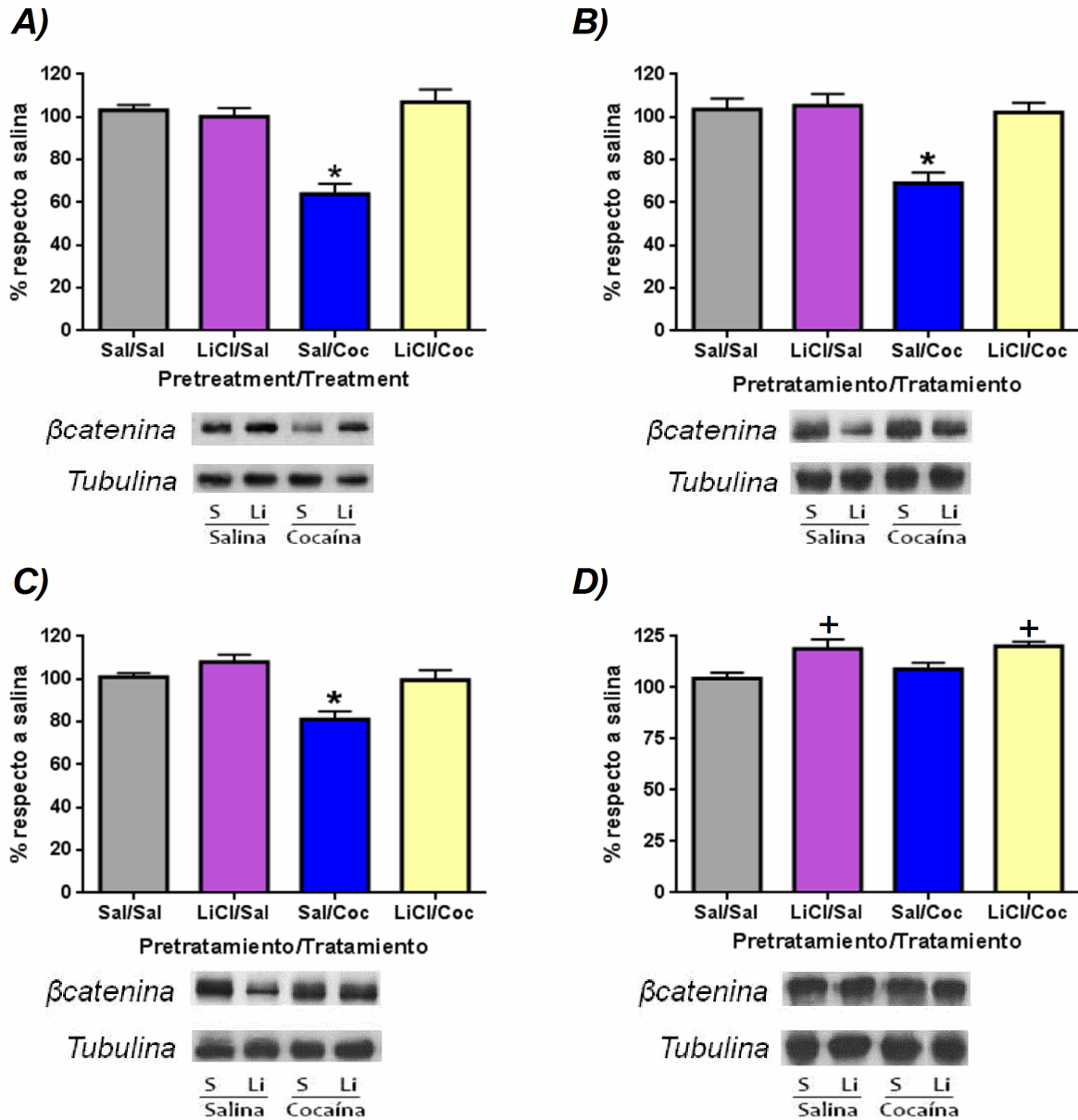


Figura 26: El LiCl bloquea el desarrollo de sensibilización motora inducido por cocaína reestableciendo los niveles de β catenina. Los gráficos de barra muestran los niveles de β catenina en la CPF (A), la Amígy. (B), el ED (C) y el NAcc (D) de animales que fueron pretratados con salina o LiCl y luego con salina o cocaína y fueron sacrificados 24hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Sal/Sal. *Significativamente diferente del resto de los grupos, $p < 0.05$. ⁺Significativamente diferente de Sal/Sal, $p < 0.05$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni ($n = 8-10$ por grupo).

Estos resultados indicarían que la activación de la vía canónica de Wnt con LiCl bloquea el desarrollo de sensibilización reestableciendo los niveles de β catenina en la CPF, Amígy y el ED.

Determinación de los niveles de β catenina en la CPF de animales pretratados con LiCl: fracciones subcelulares

En un set diferente de animales sometidos al mismo esquema experimental, se evaluaron los niveles de β catenina en fracciones subcelulares de la CPF (Fig. 27).

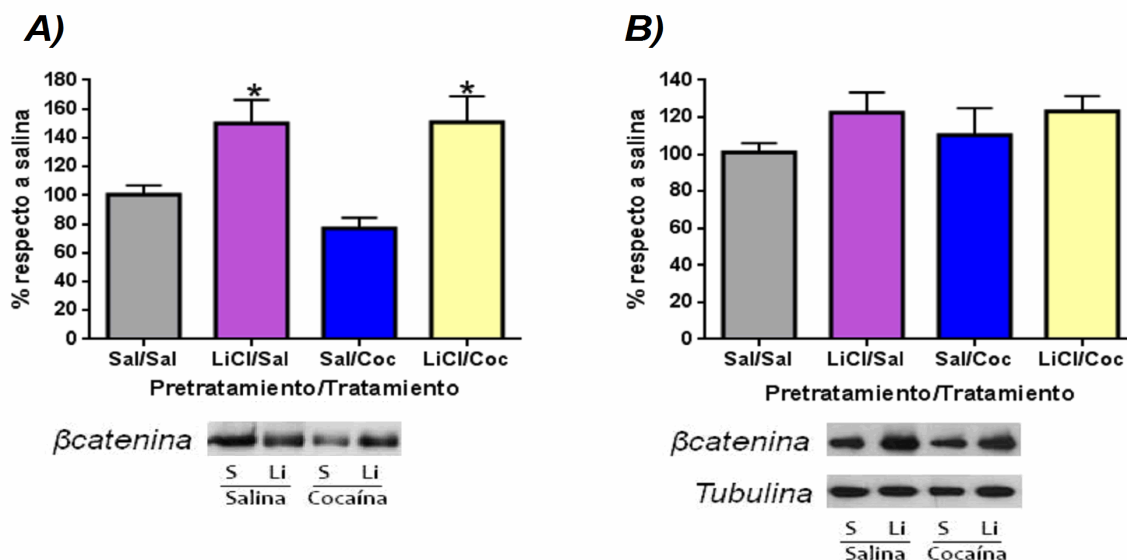


Figura 27: El LiCl restaura los niveles de β catenina en la fracción nuclear de animales tratados de forma repetida con cocaína sin modificar la fracción de membrana. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en la fracción nuclear (A) y en la de membrana (B) de animales que fueron pretratados con salina o LiCl y luego con salina o cocaína y fueron sacrificados 24hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Sal/Sal. *Significativamente distinto de Sal/Coc $p < 0.05$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni ($n=6-10$ por grupo).

La evaluación de la fracción nuclear, arrojó resultados similares en los niveles de β catenina respecto de los observados en los homogenados totales (Fig. 27 A). Un ANOVA de una vía aplicado a los datos mostrados en la Figura 27 A reveló un efecto del pretratamiento [$F(1,30) = 17,50$, $p = 0,0002$] y el análisis *post hoc* de Bonferroni indicó una diferencia significativa de los grupos que recibieron el pretratamiento con LiCl (LiCl/Sal y LiCl/Coc) con respecto al grupo Sal/Coc. Por su parte, en estos animales los niveles de β catenina en la fracción de membrana no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos evaluados (Fig. 27 B).

Determinación de la importancia de la vía del Wnt en distintas áreas del circuito de la motivación durante el desarrollo de la sensibilización a cocaína

Con el objetivo de determinar la relevancia que la disminución en los niveles de β catenina tiene en las distintas áreas durante el desarrollo de sensibilización conductual,

se realizaron infusiones intra-cerebrales de Sulindac ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{lado}$), un inhibidor específico de la vía canónica de Wnt [176], en la CPF y el ED. Este inhibidor, actúa bloqueando el dominio de unión PDZ de Dvl impidiendo la activación de la vía canónica [176], y se administró en la CPF o el ED una hora antes de cada inyección de cocaína entre los días 2 a 6 de un tratamiento repetido ($7 \times 15 \text{ mg/kg}$ de cocaína i.p.). La actividad locomotora se determinó en los días 1 y 7 del tratamiento, y los animales fueron sacrificados 24 hs después de la última inyección del tratamiento.

Infusiones intra-CPF

Estudios comportamentales

La Figura 28 muestra los resultados comportamentales obtenidos para los distintos grupos de animales que fueron pretratados con vehículo o Sulindac intra-CPF y que luego recibieron salina o cocaína. A la derecha de la figura se muestra la posición de los sitios finales de infusión determinada histológicamente.

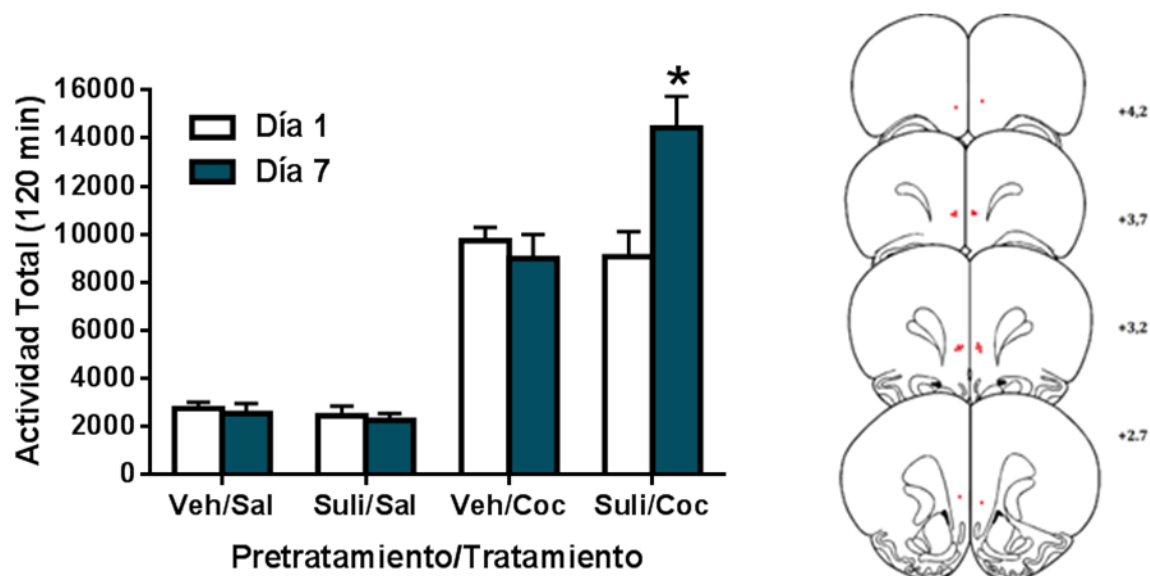


Figura 28: El Sulindac intra-CPF facilita el desarrollo de sensibilización motora inducido por un tratamiento repetido con cocaína. El gráfico de barras muestra la actividad motora total registrada durante las 2hs posteriores a la inyección en el día 1 y en el día 7 de un tratamiento repetido ($7 \times 15 \text{ mg/kg}$ i.p.). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *Significativamente diferente del resto de días en todos los grupos, $p < 0.0001$. ANOVA de dos vías para medidas repetidas, post test Bonferroni. ($n = 6-14$ por grupo). A la derecha del panel se muestran esquemas indicando los sitios de infusión. Los cortes coronales fueron adaptados de Paxinos y Watson [173].

Un ANOVA de 2 vías para medidas repetidas aplicado sobre los datos de la Figura 28, reveló que existe un efecto significativo del factor tratamiento [$F(1,30)=63.56$ $p<0.001$] y una interacción significativa entre pretratamiento x tratamiento x tiempo [$F(1,30)=8.134$ $p<0.01$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que solo en el grupo Suli/Coc la actividad en el día 7 es significativamente diferente del día 1 ($p<0,001$). En otras palabras, que la administración de Sulindac en la CPF facilita el desarrollo de sensibilización comportamental.

Estudios moleculares

Una vez corroborado el correcto sitio de infusión a través de cortes histológicos de animales perfundidos, un nuevo set de individuos fue sometido al esquema de tratamiento, evaluados comportamentalmente y sacrificados 24 hs luego de la última inyección de cocaína. La Figura 29 muestra los resultados obtenidos al evaluar los niveles de β catenina en los homogenados totales de la CPF (Fig. 29 A), la Amíg (Fig. 29 B) y el ED (Fig. 29 C) de los distintos grupos.

Un ANOVA de dos vías aplicado a los datos de la Figura 29 A reveló que en la CPF existe un efecto significativo del factor tratamiento [$F(1,21)=6,552$, $p=0,0183$] y del pretratamiento [$F(1,21)=20,40$, $p=0,0002$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni de estos datos reveló que el grupo Suli/Sal presentó diferencias significativa con el grupo Veh/Sal, mientras que el grupo Suli/Coc mostró una disminución significativa con respecto a los grupos Veh/Sal y Veh/Coc. Estos resultados, junto a las evidencias previas, indicarían que la disminución de los niveles de β catenina en la CPF sería tanto necesaria como suficiente para el desarrollo de sensibilización comportamental a cocaína.

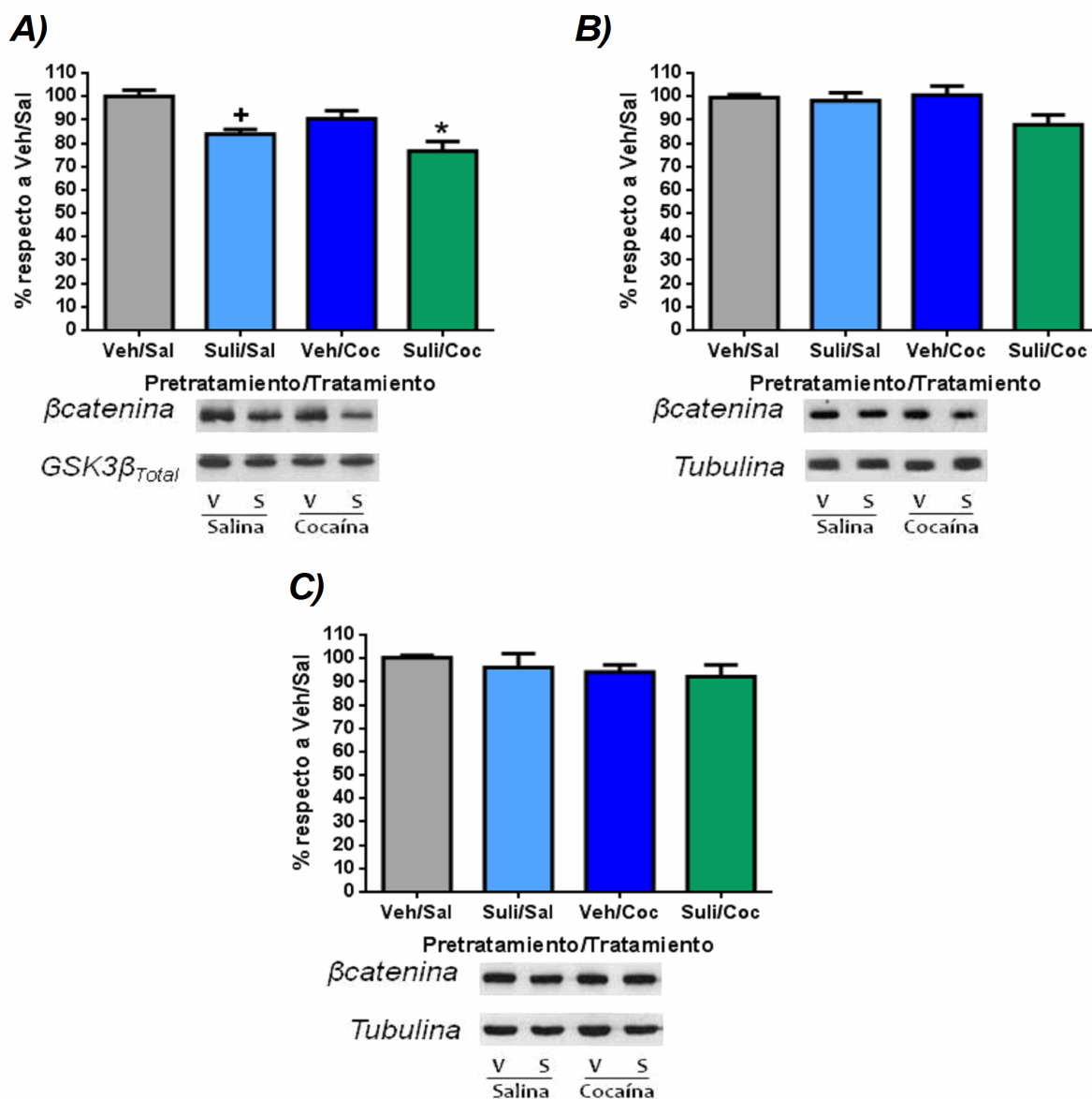


Figura 29: Niveles de β catenina en animales tratados intra-CPF con Sulindac. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en la CPF (A), la Amíg (B) y el ED (C) de animales que fueron pretratados con Vehículo o Sulindac en la CPF y luego con salina o cocaína y fueron sacrificados 24hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Veh/Sal. ⁺Significativamente diferente de Veh/Sal, ^{*}Significativamente diferente de Veh/Sal y Veh/Coc, $p < 0.05$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni ($n = 6-9$ por grupo).

Infusiones intra-ED

Estudios comportamentales

Los resultados obtenidos para los de animales pretratados con vehículo o Sulindac en el ED y que luego recibieron salina o cocaína se muestran en la Figura 30. En la misma figura se indica la posición de los sitios finales de infusión, determinada histológicamente, de los distintos grupos de animales tratados.

Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas reveló un efecto significativo del factor tratamiento [$F(1,21) = 161.63$, $p < 0.001$] y el análisis *post hoc* de Bonferroni indicó la actividad en los días 1 y 7 de los grupos Veh/Coc y Suli/Coc fue significativamente diferente respecto a los grupos Veh/Sal y Suli/Sal ($p < 0.001$). Estos resultados indicarían que el tratamiento con Sulindac en el ED no afectaría la respuesta frente al tratamiento repetido con cocaína.

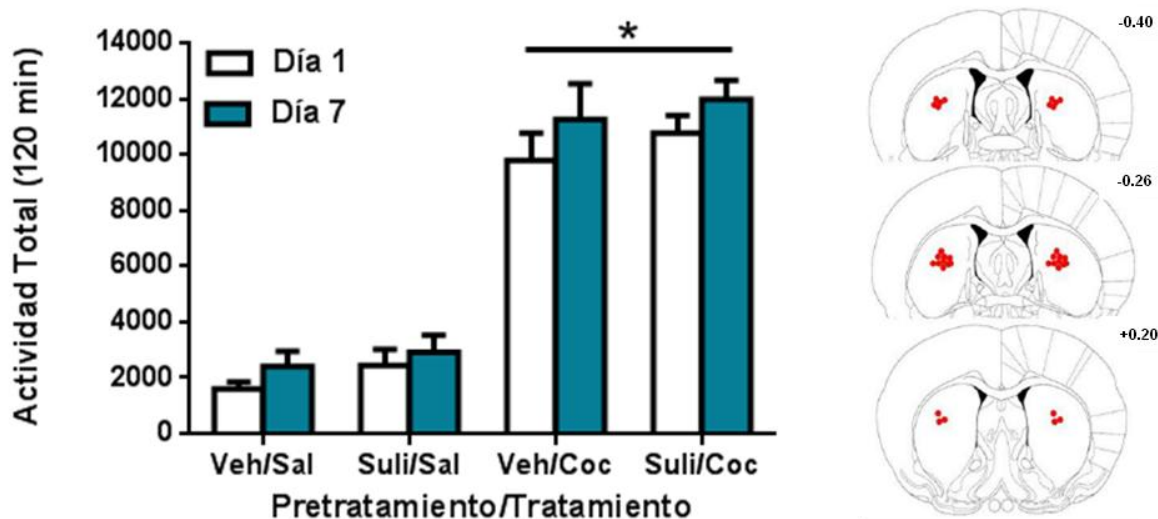


Figura 30: El Sulindac intra-ED no modifica la respuesta motora inducida por un tratamiento repetido con cocaína. El gráfico de barras muestra la actividad motora total registrada durante las 2hs posteriores a la inyección en el Día 1 y en el Día 7 de un tratamiento repetido (7 x 15mg/kg p.c.). Los resultados están expresados como la media \pm EEM. *Significativamente diferente del día 1 y 7 de los grupos controles (Veh/Sal y Suli/Veh), $p < 0.05$. ANOVA de dos vías para medidas repetidas, post test Bonferroni. ($n = 5-9$ por grupo). A la derecha del panel se muestran esquemas indicando los sitios de infusión. Los cortes coronales fueron adaptados de de Paxinos y Watson [173]

Estudios moleculares

Nuevamente, luego de corroborar histológicamente la posición de las cánulas, se realizó la evaluación de los niveles de β catenina en un grupo diferente de animales (Fig. 31). Es importante aclarar que, al igual que para las inyecciones en la CPF, este nuevo set de animales fue evaluado comportamentalmente y sacrificado a las 24 hs.

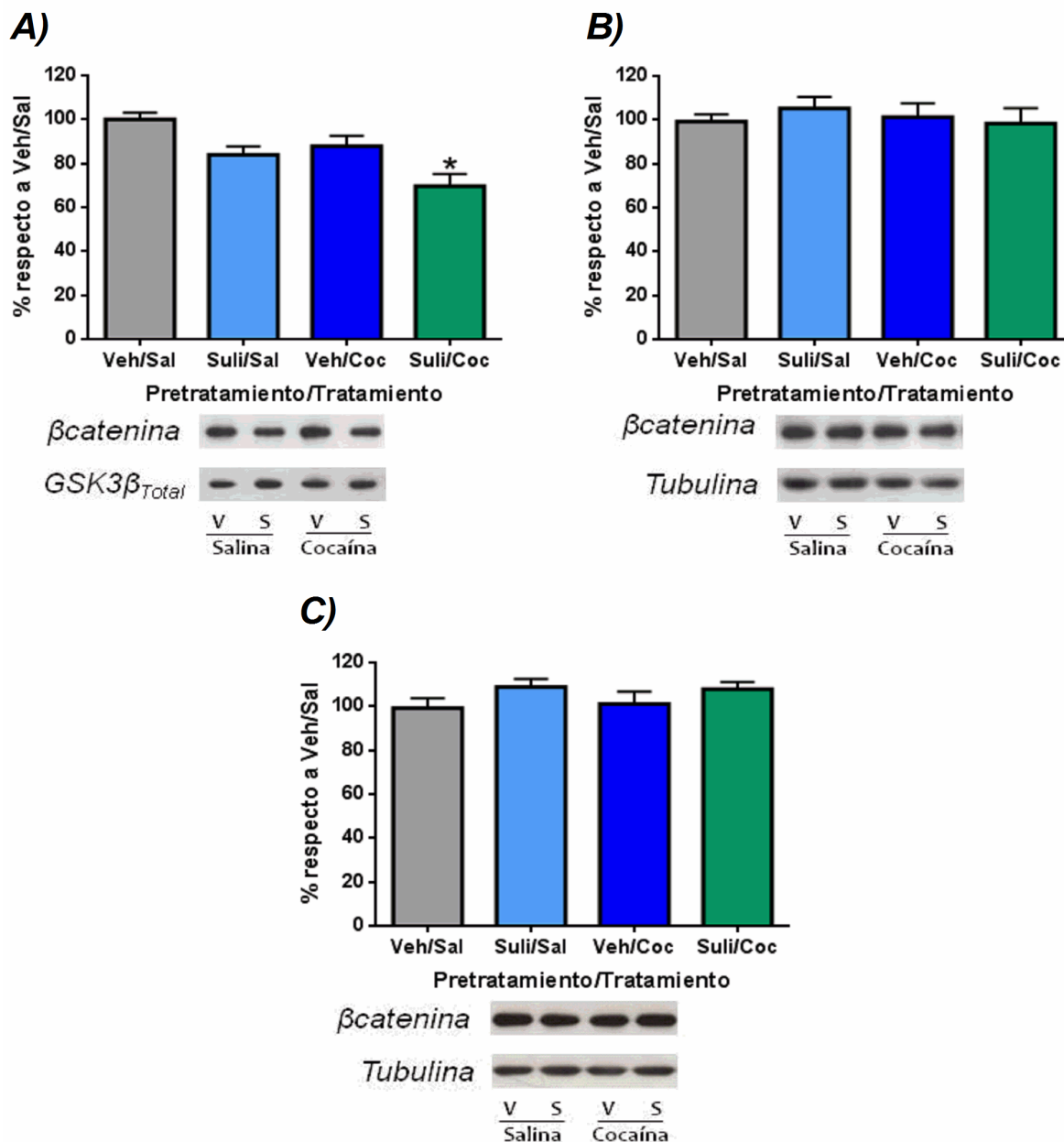


Figura 31: Niveles de β catenina en animales tratados intra-ED con Sulindac. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en el ED (A), la CPF (B) y la Amíg (C) de animales que recibieron Vehículo o Sulindac en la ED y luego salina o cocaína, y fueron sacrificados a las 24hs. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Veh/Sal. *Significativamente diferente de Veh/Sal, $p < 0.05$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni. ($n = 5-9$ por grupo).

Un ANOVA de dos vías aplicado a los datos de la Figura 31 indicó un efecto significativo del factor tratamiento [$F(1,19)= 7,764$, $p=0,0118$] y del pretratamiento [$F(1,19)= 12,98$, $p=0,0019$] en el ED (Fig. 31 A). El análisis *post hoc* de Bonferroni para los datos del ED reveló que el grupo Suli/Coc presentó diferencias significativa con el grupo Veh/Sal. Estos datos, indicarían que la disminución en los niveles de β catenina en esta área sería necesaria pero no así suficiente para desencadenar la sensibilización comportamental.

EXPRESIÓN DE SENSIBILIZACIÓN A COCAÍNA

Evaluación del estado de la vía Wnt/ β catenina en distintas áreas cerebrales del sistema mesocorticolímbico de animales que expresaron sensibilización a cocaína

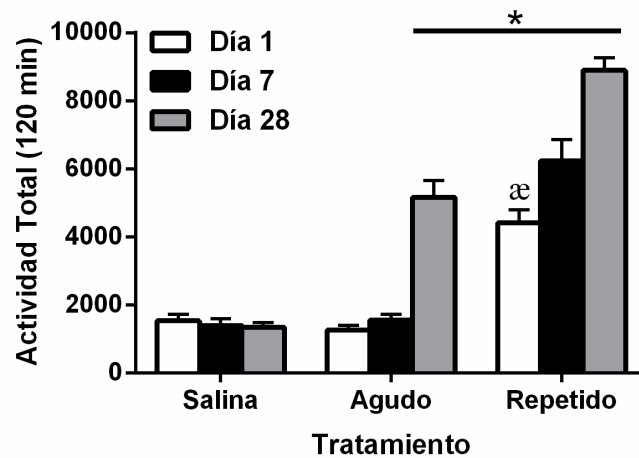
Estudios comportamentales

Al igual que en el caso del desarrollo, se evaluó comportamentalmente la expresión de la sensibilización. Para esto, los animales recibieron 7 inyecciones de cocaína (2x15mg/kg, 5x30mg/kg) y permanecieron sin contacto con la droga por tres semanas. Luego recibieron un desafío con 15 mg/kg de cocaína en el día 28. En la Figura 32 A se muestran los resultados obtenidos durante cada día evaluado para todos los animales que expresaron la sensibilización junto con sus correspondientes controles. En la Figura 32 B se presentan sólo los datos de la actividad motora en el día 28 de los animales que expresaron la sensibilización y fueron sacrificados 3 o 24hs luego de la última inyección del tratamiento, además de los correspondientes controles. Como fuera mencionado, en todos los casos los animales incluidos en el grupo Repetido fueron aquellos que expresaron la sensibilización comportamental a la cocaína, es decir, aquellos que mostraron un aumento de la actividad locomotora en el día 28 de por lo menos el 20% respecto del primer día del tratamiento [119].

Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas aplicado a los datos de la Figura 32 A reveló un efecto significativo del factor tratamiento [$F(2,39)= 97,65$, $p<0,0001$], y tiempo [$F(2,78)= 59,44$, $p<0,0001$], así como de la interacción tratamiento x tiempo [$F(4,78)= 17,28$, $p<0,0001$]. El análisis *post hoc* de estos datos reveló que el grupo con tratamiento repetido presentó diferencias significativas, tanto en la comparación de la actividad motora de los días 7 y 28 con respecto a la del día 1, como así también entre

los días 7 y 28. Finalmente, los animales pertenecientes al grupo agudo solo presentaron diferencia significativa con respecto a animales Salina en el día 28.

A)



B)

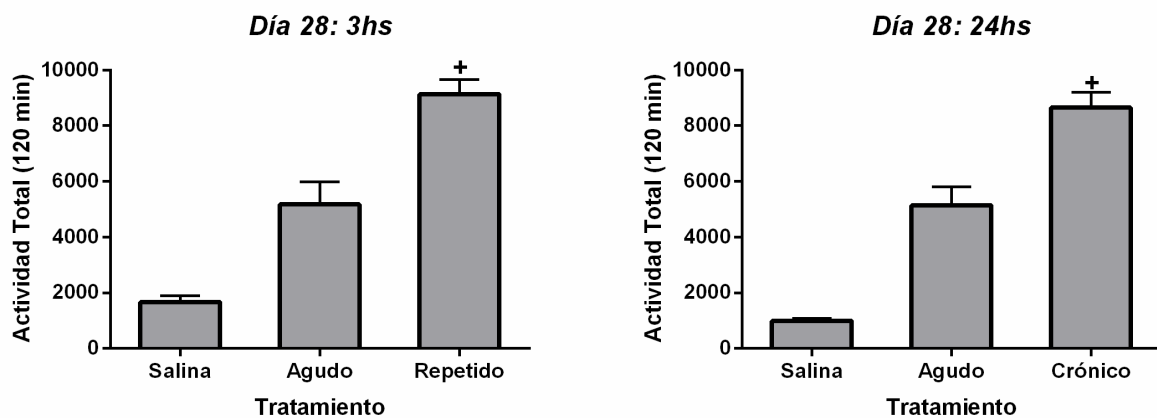


Figura 32: Expresión de sensibilización motora inducido por cocaína crónica. **A)** El gráfico de barras muestra la actividad motora total registrada durante 2hs en el Día 1, 7 y 28 de animales sacrificados 3 hs o 24 hs luego de la última inyección. **B)** Actividad motora total registrada durante 2hs luego de la inyección en el día 28 en animales sacrificados a 3 hs (panel izquierdo) o 24hs (panel derecho) luego de la inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *Significativamente diferente de Salina en el Día correspondiente, $p < 0,05$, ^aSignificativamente diferente del Día 7 y 28 de cocaína repetida, $p < 0,05$, ⁺Significativamente diferente del resto de los tratamientos, $p < 0,05$. **(A)** ANOVA de dos vías para medidas repetidas, post test Bonferroni. ($n = 12-16$ por grupo). **(B)** ANOVA de una vía, post test Bonferroni. ($n = 6-8$ por grupo).

En el caso de la Figura 32 B, un ANOVA de una vía reveló diferencia significativas entre los diferentes tratamientos en animales sacrificados tanto a 3 hs [$F(2,18) = 39,52$, $p < 0,0001$], como a 24 hs [$F(2,18) = 51,54$, $p < 0,0001$] luego de recibida la última inyección del tratamiento. El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró que la

actividad en el día 28 de los animales que recibieron el tratamiento repetido, ya sea sacrificados a 3 hs como a 24 hs, fue significativamente diferente del resto de los grupos.

Estudios moleculares

Determinación de los niveles de β catenina durante la expresión de la sensibilización comportamental a cocaína

Finalizada la evaluación comportamental de los distintos grupos, se procedió a evaluar los niveles de β catenina tanto a 3 como a 24 hs luego de la última inyección (Fig. 33 y 34, respectivamente). La Figura 33 muestra los resultados obtenidos para los niveles de β catenina en el NAcc (Fig. 33 A), la CPF (Fig. 33 B) y el ED (Fig. 33 C) de animales sacrificados 3 hs luego de recibida la última inyección del tratamiento en el día 28. El análisis de ANOVA de una vía aplicado a estos datos indicó un efecto significativo del tratamiento tanto en el NAcc [$F(2,18) = 18,11$, $p < 0,0001$], como en el ED [$F(2,17) = 6,541$, $p = 0,0078$], no observándose efectos en la CPF. El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó una diferencia significativa en los niveles de β catenina de los animales con tratamiento repetido que expresaron la sensibilización a cocaína respecto del resto de los grupos en el NAcc (Fig. 33 A), mientras que en el ED (Fig. 33 C) el tratamiento repetido mostró diferencias significativas respecto a aquellos animales que recibieron solo salina.

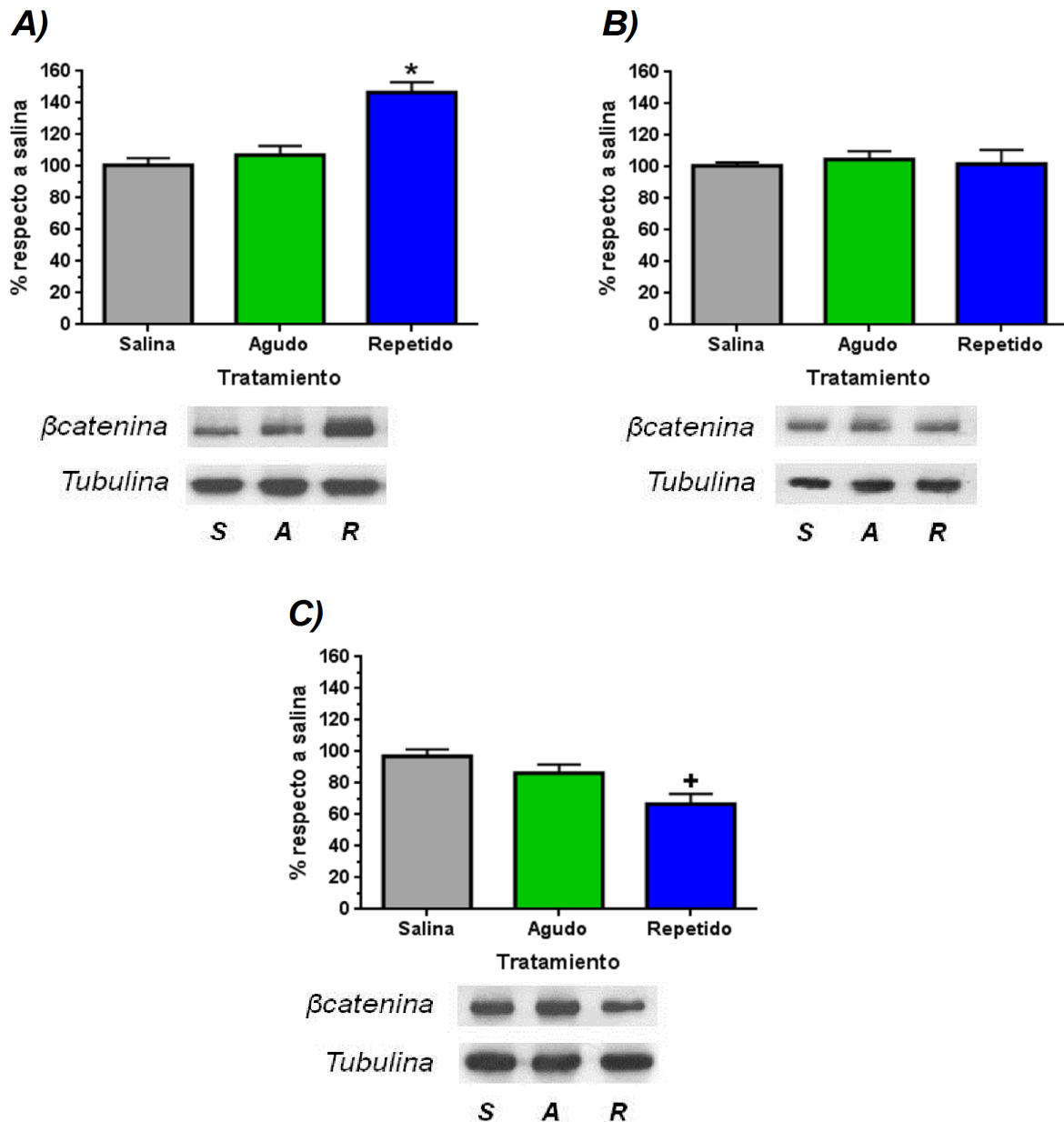


Figura 33: Niveles de β catenin durante la expresión de sensibilización a cocaína a 3 hs. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenin en homogenados totales de la NAcc (A), la CPF (B) y el ED (C) de animales que expresaron sensibilización (cocaína repetida) o sus controles (Salina y Cocaína Aguda) y fueron sacrificados 3 hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente del resto de los grupos, $p < 0.05$; +Significativamente diferente de Salina, $p < 0.05$. ANOVA de una vía, post test Bonferroni ($n = 6-8$ por grupo).

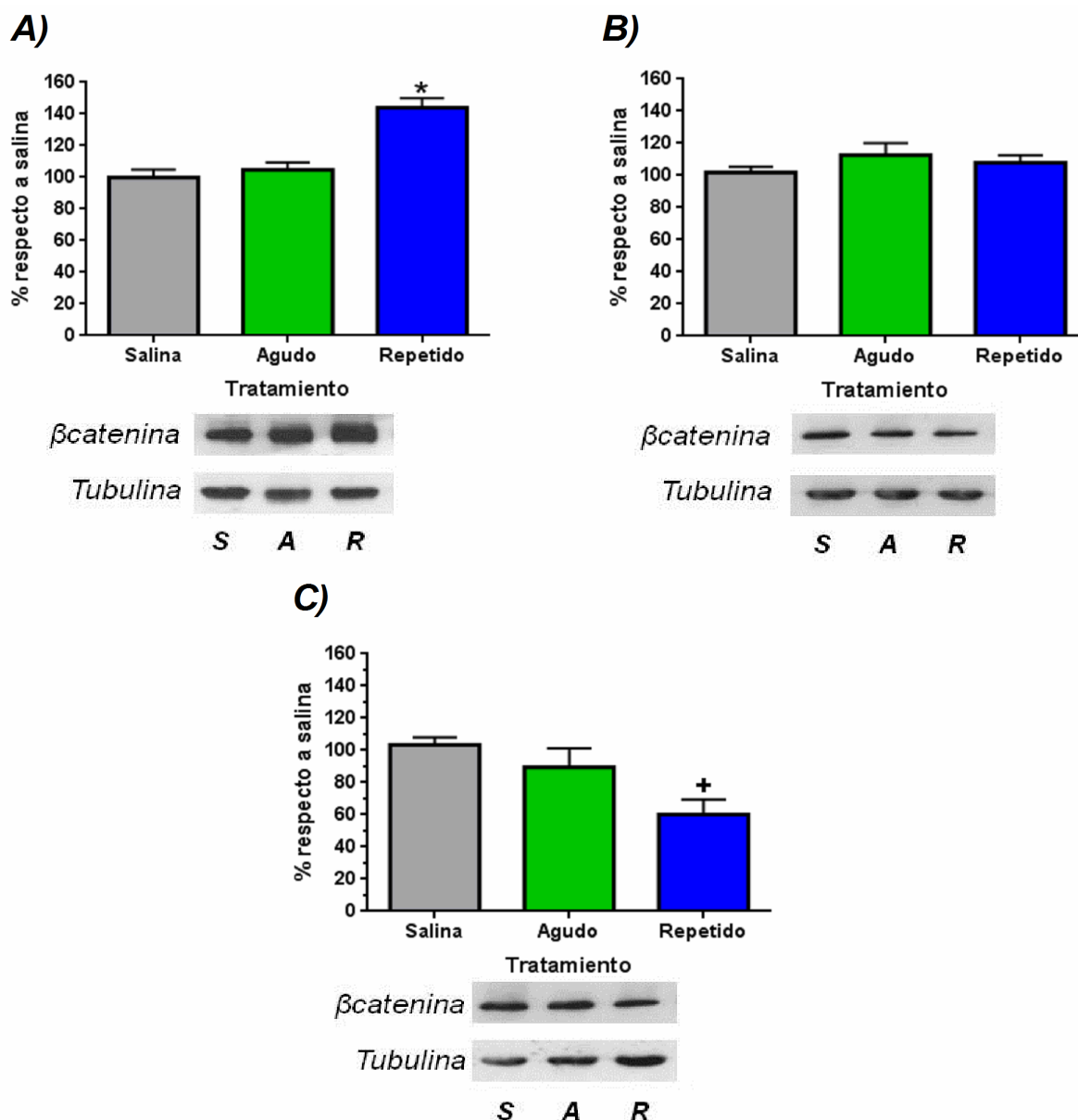


Figura 34: Niveles de β catenina durante la expresión de sensibilización a cocaína a 24 hs. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina en homogenados totales de la NAcc (A), la CPF (B) y el ED (C) de animales que expresaron sensibilización (cocaína repetida) o sus controles (Salina y Cocaína Aguda) y fueron sacrificados 24 hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente del resto de los grupos, $p < 0.05$; +Significativamente diferente de Salina, $p < 0.05$. ANOVA de una vía, post test Bonferroni ($n = 6-8$ por grupo).

La evaluación estadística de los niveles de β catenina 24 hs luego de la última inyección del tratamiento (Fig. 34) reveló un efecto significativo del tratamiento tanto en el NAcc [$F(2,19) = 20.53$, $p < 0.0001$] (Fig. 34 A), como en el ED [$F(2,16) = 5.179$, $p = 0.0184$] (Fig. 34 C), sin indicar cambios en la CPF (Fig. 34 B). El análisis *post hoc*

de Bonferroni mostró una diferencia significativa en los niveles de β catenina de los animales que expresaron la sensibilización a cocaína (tratamiento repetido) respecto del resto de los grupos en el NAcc (Fig. 34 A), mientras que en el ED (Fig. 34 C) el tratamiento repetido solo mostró diferencia al tratamiento con salina.

Los resultados indicarían que aquellos animales que expresan la sensibilización comportamental a cocaína presentan un incremento en los niveles de β catenina en el NAcc, junto con una disminución de esta proteína en el ED que se observa tanto 3 hs como 24 hs luego de la inyección en el día 28.

Evaluación de distintos efectores de la vía canónica de Wnt en el NAcc de animales que expresaron la sensibilización a cocaína

La expresión de la sensibilización dependería principalmente de los cambios plásticos que se producen en el NAcc, de modo que se comenzó evaluando la actividad de la vía canónica de Wnt en éste área. En la Figura 35 se muestran los resultados de la determinación de la actividad de la proteína GSK3 β en homogenados totales (Fig. 35 A) y de los niveles de β catenina en la fracción nuclear (Fig. 35 B) de animales que expresaron la sensibilización comportamental a cocaína y fueron sacrificados 24 hs luego de la última inyección en el día 28.

La comparación simple de los resultados de la Figura 35 A indicó que los animales que expresaron la sensibilización a cocaína presentan niveles significativamente aumentados de la GSK3 β activa (*t test*, $p < 0,03$) en el NAcc. Así mismo, la comparación de los niveles de β catenina en la fracción nuclear (Fig. 35 B) reveló un aumento significativo de la proteína en los animales que expresaron la sensibilización (*t test*, $p < 0,05$).

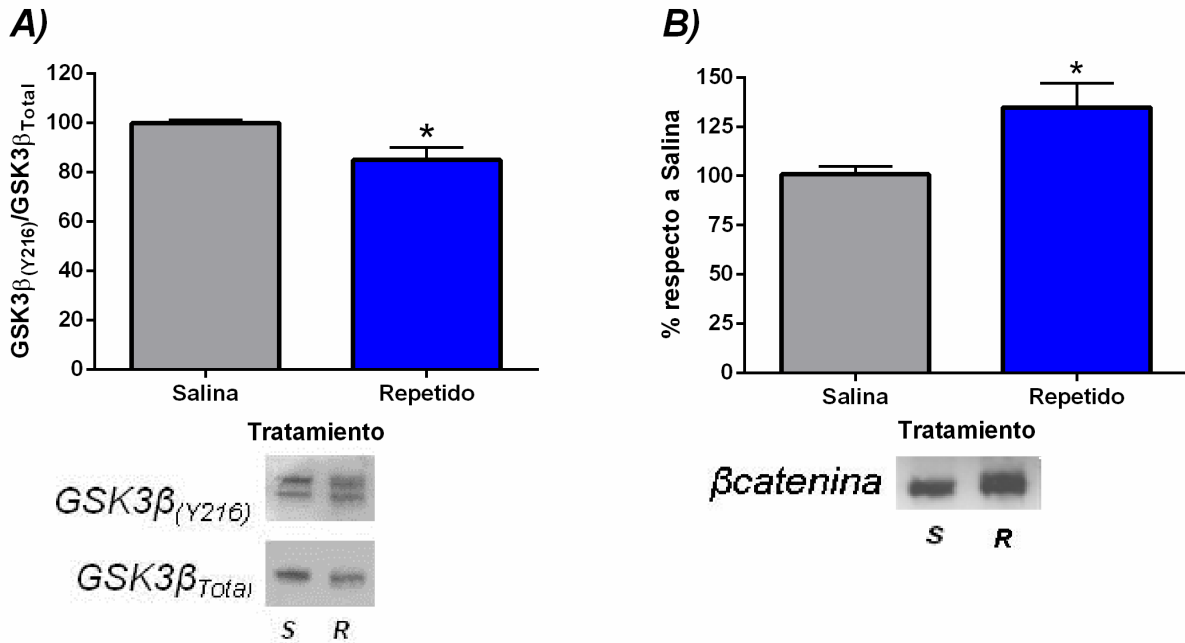


Figura 35: Estado de la vía canónica de Wnt en el NAcc durante la expresión de la sensibilización. El gráfico de barras muestra los niveles de $GSK3\beta$ activa en homogenados totales de NAcc (A) y los niveles de $\beta catenina$ en la fracción nuclear del NAcc (B) de animales tratados con salina o cocaína que fueron sacrificados 24hs después de la última inyección en el día 28 del tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de Salina $p < 0.05$, t test. ($n = 6$ por grupo).

En conjunto, estos resultados indicarían que la expresión de la sensibilización a cocaína estaría relacionada con un aumento en la actividad de la vía canónica de Wnt en el NAcc.

Evaluación de los niveles de $\beta catenina$ y de la actividad de $GSK3\beta$ en el NAcc luego de un período de ausencia de cocaína

Con el fin de determinar si el aumento en los niveles de $\beta catenina$ y la disminución en la actividad de $GSK3\beta$ observados en el NAcc durante la expresión de la sensibilización surgen como respuesta al desafío con cocaína o son modificaciones que se producen en aquellos animales que desarrollaron la sensibilización durante el período sin contacto con la droga, se trabajó con un nuevo set de animales. Este nuevo grupo fue tratado según el esquema de desarrollo de sensibilización y luego de la evaluación comportamental, aquellos animales que sensibilizaron, permanecieron sin contacto con la droga durante tres semanas. En el día 28 se les realizó una inyección con

salina y se los sacrificó 24 hs después. Este grupo se denominó Cocaína/ Salina (Coc/Sal).

Estudios comportamentales

En la Figura 36 se muestran los resultados comportamentales para este nuevo grupo de animales, junto con los resultados de controles Salina y de animales que expresaron la sensibilización.

Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas aplicados a los datos de la Figura 36 reveló un efecto significativo del factor tratamiento [$F(2,19)= 34,08$, $p<0,0001$], y tiempo [$F(2,38)= 23,67$, $p<0,0001$], así como de la interacción tratamiento x tiempo [$F(4,38)= 29,23$, $p<0,0001$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que el grupo que expresó la sensibilización (tratamiento repetido), así como el grupo Coc/Sal presentaron diferencias significativas en la comparación de la actividad motora de los días 7 y 28 con respecto a la del día 1, como así también en la comparación entre los días 7 y 28.

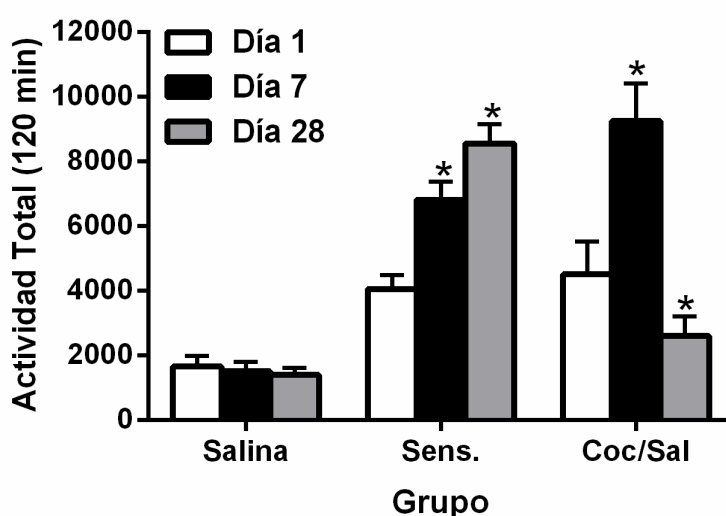


Figura 36: Actividad locomotora total registrada durante las 2 hs posteriores a la inyección en los Días 1, 7 y 28. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *Significativamente diferente del día 1 del grupo correspondiente, $p<0.05$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni ($n=6-8$ por grupo).

Estudios moleculares

La Figura 37 muestra los resultados obtenidos al analizar los niveles de β catenina (Fig. 37 A) y de GSK3 β activa (Fig. 37 B) en homogenados totales del NAcc obtenidos de animales sacrificados 24 hs luego de la última inyección de los distintos tratamientos. La evaluación estadística de estos datos reveló un efecto significativo del tratamiento tanto en los niveles de β catenina [$F(2,17) = 8,721$, $p < 0,003$], como en los de GSK3 β activa [$F(2,15) = 3,707$, $p < 0,05$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró una diferencia significativa en los niveles de β catenina y GSK3 β activa de los animales que expresaron la sensibilización a cocaína (tratamiento repetido) respecto del resto de los grupos (Salina y Coc/Sal).

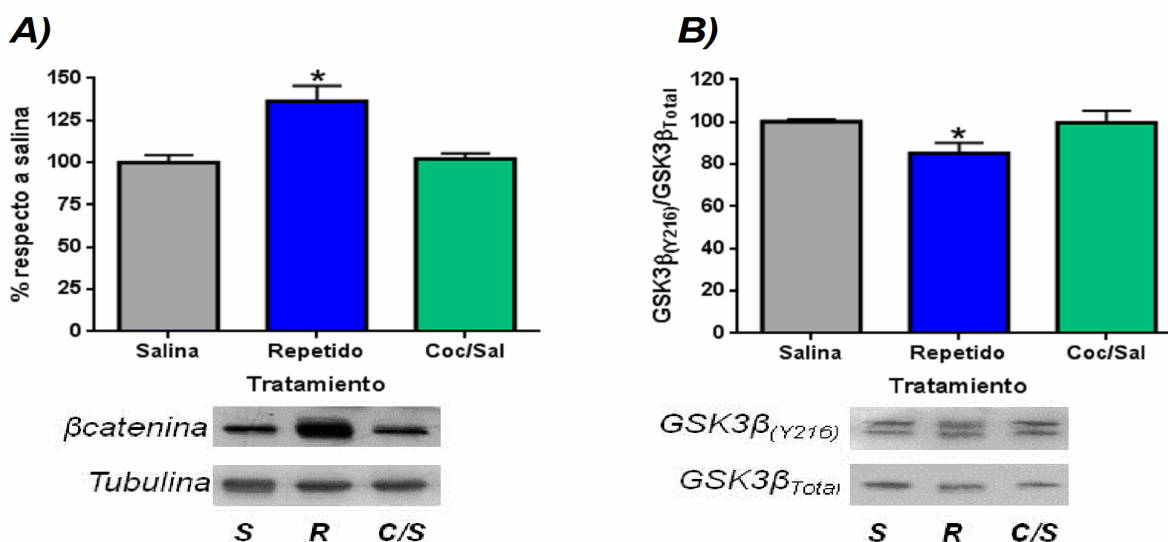


Figura 37: Niveles de β catenina y de GSK3 β activa en el NAcc de animales Coc/Sal. Los gráficos de barras muestran los niveles de β catenina (A) y de GSK3 β (B) en homogenados totales del NAcc de animales que fueron tratados con salina, cocaína o Coc/Sal y fueron sacrificados 24hs después de la última inyección realizada en el día 28. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de los otros grupos analizados $p < 0.05$. ANOVA de una vía, *post test* Bonferroni. ($n=6-8$ por grupo).

Estos resultados indicarían que la presencia de la cocaína es necesaria para que se produzcan las modificaciones en la actividad de la GSK3 β y en los niveles de β catenina que se observan en el NAcc de los animales que expresaron la sensibilización comportamental a cocaína.

Determinación de los niveles de β catenina en el NAcc de animales que no expresaron la sensibilización a cocaína

El aumento en los niveles de β catenina en el NAcc de animales que desarrollaron la sensibilización comportamental luego de un período de ausencia de la droga dependería del desafío con cocaína. Para determinar si estas modificaciones están además relacionadas con el aumento en la respuesta motora característico del modelo, se evaluaron los niveles de β catenina en el NAcc de animales que no expresaron la sensibilización comportamental.

Estudios comportamentales

La Figura 38 muestra la actividad locomotora de los distintos grupos de animales separados en función del criterio propuesto por Pierce y col. [117].

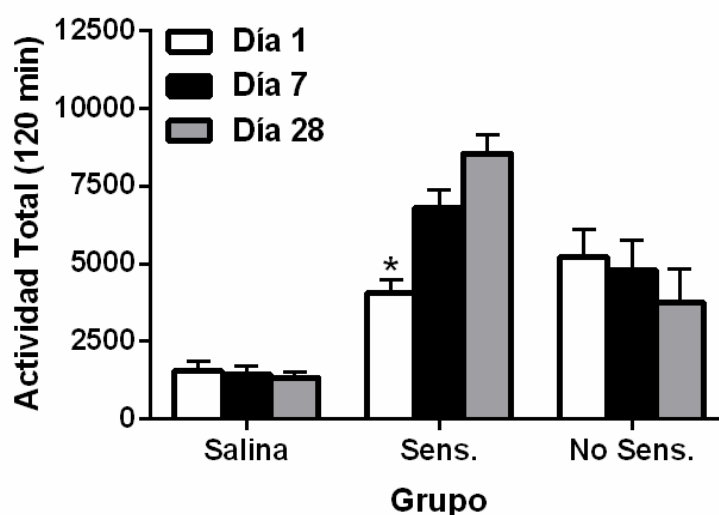


Figura 38: Actividad locomotora total registrada durante las 2 hs posteriores a la inyección en los Días 1, 7 y 28. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *Significativamente diferente del resto de los días del grupo correspondiente, $p < 0.05$. ANOVA de dos vías, post test Bonferroni ($n=8-9$ por grupo).

Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas aplicados a los datos de la Figura 38 indicó un efecto significativo del factor grupo [$F(2,22)=36,43$, $p < 0,0001$], así como de la interacción grupo x tiempo [$F(4,44)=6,972$, $p=0,0002$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que el grupo que expresó la sensibilización presentó diferencias significativas en la comparación de la actividad motora de los días 7 y 28 con respecto a

la del día 1. En tanto que, estas diferencias no se observaron en el grupo que no sensibilizó.

Estudios moleculares

La evaluación de los niveles de β catenina en homogenados totales del NAcc de animales sacrificados 24 hs luego de la última inyección se muestra en la Figura 39. Un ANOVA de una vía aplicado sobre estos datos reveló un efecto significativo de grupo [$F(2,17)= 10,17$, $p<0,003$], mientras que el análisis *post hoc* de Bonferroni mostró que el grupo sensibilizado era diferente del resto.

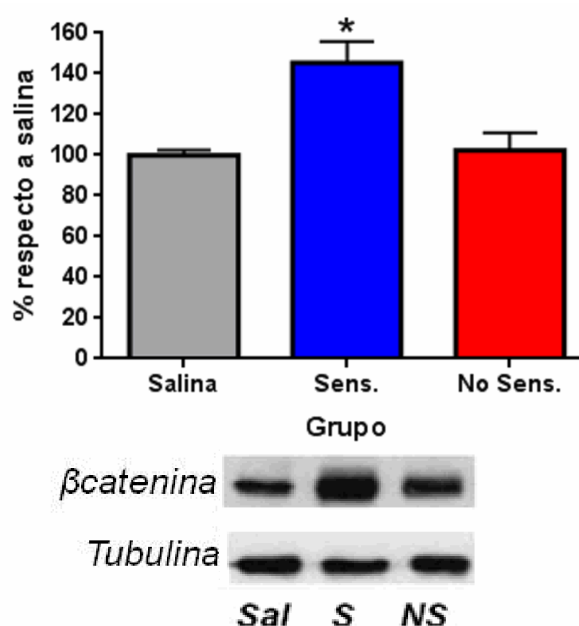


Figura 39: Niveles de β catenina en el NAcc de animales que no expresaron la sensibilización a cocaína. El gráfico de barras muestra los niveles de β catenina en homogenados totales del NAcc de animales que expresaron la sensibilización comportamental (Sens) o no (No sens) y fueron sacrificados 24hs después de la última inyección realizada en el día 28. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina. *Significativamente diferente de los otros grupos analizados, $p<0,05$. ANOVA de una vía, post test Bonferroni ($n=6-7$ por grupo).

Estos resultados indicarían que el aumento en los niveles de β catenina en el NAcc estaría directamente asociados a la expresión de la sensibilización. En conjunto los resultados obtenidos sugerirían que los cambios en la vía de Wnt/ β catenina son necesarios para la expresión comportamental de la sensibilización y requieren de la presencia de cocaína.

Evaluación de los niveles de β catenina en el ED: determinaciones luego de un período de abstinencia y en animales que no expresaron la sensibilización a cocaína

De manera similar a lo realizado en el NAcc y con el objetivo de evaluar la importancia de los cambios observados en los niveles de β catenina en el ED durante la expresión de la sensibilización se evaluó en éste área al efector final de la vía canónica en animales que no expresaron la sensibilización; así como en aquellos que recibieron salina en el día 28 (Coc/Sal).

Estudios comportamentales

La Figura 40 muestra los resultados comportamentales obtenidos para los distintos grupos.

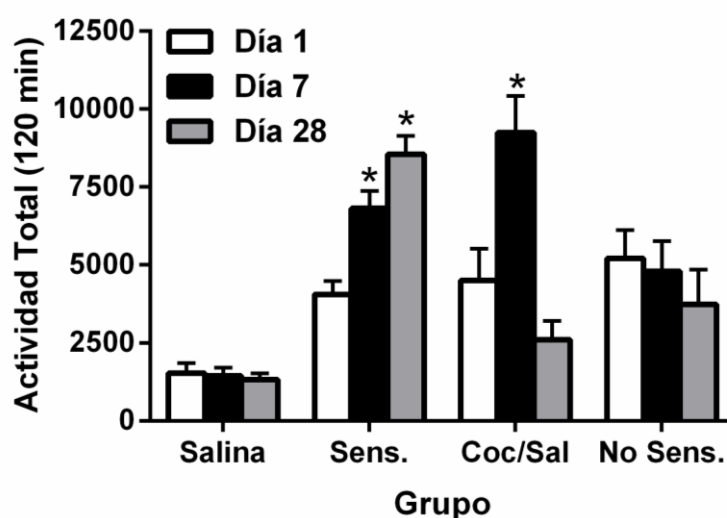


Figura 40: Niveles Actividad locomotora total registrada durante las 2 hs posteriores a la inyección en los Días 1, 7 y 28. El gráfico de barras muestra la actividad motora total registrada durante las 2hs posteriores a la inyección en el día 1, 7 y 28 de los distintos grupos de animales. Las barras representan la media \pm EEM. *Significativamente diferente del día 1 del grupo correspondiente, $p < 0,05$. ANOVA de dos vías para medidas repetidas, post test Bonferroni. ($n=6-9$ por grupo)

Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas aplicado a estos datos reveló un efecto significativo del factor tratamiento [$F(3,27)= 21,02$, $p < 0,0001$], y tiempo [$F(2,54)= 9,331$, $p = 0,0003$], así como de la interacción tratamiento x tiempo [$F(6,54)=$

11,06, $p < 0,0001$]. El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que el grupo que expresó la sensibilización, así como el grupo Coc/Sal presentaron diferencias significativas en la comparación de la actividad motora de los días 7 y 28 con respecto a la del día 1, como así también entre los días 7 y 28.

Estudios moleculares

La Figura 41 muestra los resultados moleculares para los niveles de β catenina en el ED de los distintos grupos evaluados. El análisis de ANOVA de una vía aplicado a los datos de la Figura 41 reveló un efecto significativo del grupo [$F(3,22) = 33,23$, $p < 0,0001$], mientras que el análisis *post hoc* de Bonferroni mostró que tanto el grupo sensibilizado, como el Coc/Sal presentaron diferencias significativas en la comparación con el resto de los grupos evaluados.

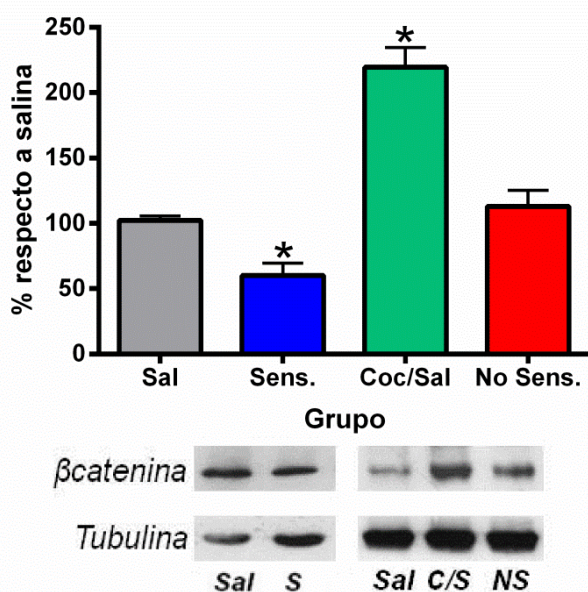


Figura 41: Niveles de β catenina en homogenados totales de ED de animales Coc/Sal y no sensibilizados. El gráfico de barras muestra los niveles de β catenina en animales Salina, Sensibilizados (Sens.), Cocaína/Salina (Coc/Sal) y No Sensibilizados (No Sens.) que fueron sacrificados 24hs después de la última inyección realizada en el día 28 del tratamiento. Los resultados se expresan como porcentajes de variación en función del grupo Salina y las barras representan la media \pm EEM. *Significativamente diferente del resto de los tratamientos, $p < 0,05$. ANOVA de una vía, *post test* Bonferroni. ($n = 6-8$ por grupo).

Estos datos, junto con la disminución observada en los niveles de β catenina en los animales que expresaron sensibilización, plantearían una importante relación entre los cambios en los niveles de β catenina en el ED y la respuesta comportamental a cocaína. En otras palabras, los resultados indicarían que, junto con las modificaciones provocadas durante el desarrollo y luego de un período sin contacto con la droga, la expresión de la sensibilización tendría lugar siempre y cuando el desafío con cocaína pueda llevar los niveles de β catenina a valores menores que los del grupo Salina.

Evaluación de los efectos de un pretratamiento sistémico con un activador de la vía canónica del Wnt (LiCl) durante el desarrollo de sensibilización en la respuesta a largo plazo frente a cocaína.

El pretratamiento sistémico con un activador de la vía canónica de Wnt bloquea el desarrollo de sensibilización a cocaína restaurando los niveles de β catenina en distintas áreas del circuito de la motivación. Para evaluar si estas modificaciones permanecen en el tiempo dando lugar a efectos a largo plazo, se pretrataron animales con LiCl (30 mg/Kg. i.p. 30 min antes de cada inyección de cocaína o salina); y, se evaluaron las respuestas comportamentales del día 1 y 7, como fuera previamente descrito. Una vez finalizado este tratamiento los distintos grupos permanecieron tres semanas en sus cajas hogar sin contacto con la droga. Luego, en el día 28 se evaluó nuevamente la respuesta motora ante una última inyección de cocaína (15 mg/Kg i.p.) o salina (1 ml/Kg i.p.). Todos los animales fueron sacrificados 24 hs luego de la última inyección.

Estudios comportamentales

La Figura 42 muestra los resultados comportamentales obtenidos para los días 1, 7 y 28 de animales que fueron pretratados con salina (Fig. 42 A) o LiCl (Fig. 42 B). En la Figura 42 C se presentan los resultados de la actividad motora en el día 28 de todo los grupos evaluados.

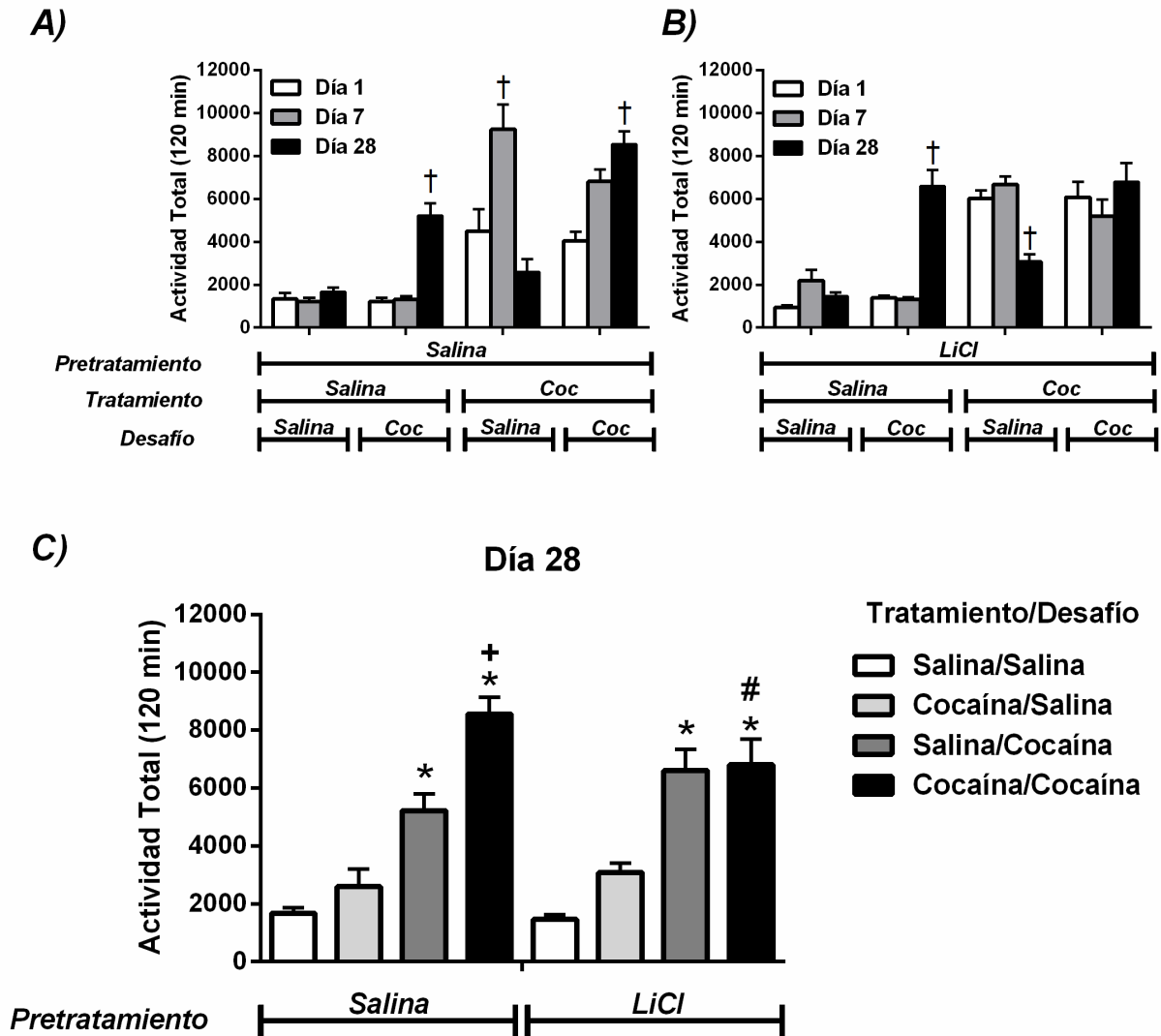


Figura 42: Actividad locomotora total en los Días 1, 7 y 28. **A)** Actividad locomotora total registrada durante las 2 hs posteriores a la inyección en los días 1, 7 y 28 de animales que fueron pretratados con solución salina, tratados con salina o cocaína y que recibieron un desafío con salina o cocaína. **B)** Actividad locomotora total registrada durante las 2 hs posteriores a la inyección en los días 1, 7 y 28 de animales que fueron pretratados con LiCl, tratados con salina o cocaína y que recibieron un desafío con salina o cocaína. **C)** Actividad locomotora total registrada durante las 2 hs posteriores a la inyección en el día 28 de animales que fueron pretratados con salina o LiCl, tratados con salina o cocaína y que recibieron un desafío con salina o cocaína (barras negras de los gráficos A y B). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. †Significativamente diferente del resto de los días en el grupo correspondiente. *Significativamente diferente de su respectivo Sal/Sal, $p < 0,001$; †Significativamente diferente de su respectivo Sal/Coc, $p < 0,01$; #Significativamente diferente de Sal/Coc/Coc, $p < 0,05$. ANOVA de dos vías para medidas repetidas, post test Bonferroni (A). ANOVA de tres vías para medidas repetidas, post test LSD (B) ($n = 8 - 9$ por grupo).

Un ANOVA de tres vías para medidas repetidas aplicado a los datos de las Figuras 42 A y B reveló una interacción significativa entre los factores tiempo x

pretratamiento x tratamiento x desafío [$F(2,98)=4,268$, $p<0,03$], mientras que el análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que en los animales Sal/Sal/Coc y Sal/Coc/Coc presentaron diferencias en la actividad cuando se comparó el día 28 con el resto de los días evaluado, mientras que el grupo Sal/Coc/Sal mostró diferencias significativas en el día 7 respecto del día 1 y 28 (Fig 42 A). Por su parte, los animales LiCl/Sal/Coc y LiCl/Coc/Sal revelaron diferencias significativas en la actividad del día 28 en comparación con los días 1 y 7 (Fig. 42 B).

El análisis de ANOVA de 3 vías aplicado a la Figura 42 C reveló un efecto significativos del desafío [$F(1,49)=118,7$, $p<0,0001$], del tratamiento [$F(1,49)=13,8$, $p=0,001$], así como de la interacción pretratamiento x tratamiento x desafío [$F(1,49)=4,28$ $p=0,044$]. El análisis *post hoc* de LSD indicó que la actividad de los animales Sal/Sal/Coc y Sal/Coc/Coc fue significativamente mayor a la de los animales Sal/Sal/Sal, mientras que la de las ratas LiCl/Sal/Coc y LiCl/Coc/Coc también presentó diferencias significativas respecto a la actividad de las LiCl/Sal/Sal. Finalmente, el grupo Sal/Coc/Coc mostró diferencias significativas respecto a los grupos Sal/Sal/Coc y LiCl/Coc/Coc.

Estos resultados indicarían que el pretratamiento con LiCl durante el desarrollo tiene efectos a largo plazo en la respuesta locomotora a cocaína. Dado que, estos animales son incapaces de expresar la sensibilización compartamental inducida por cocaína.

Estudios moleculares

La Figura 43 muestra los resultados para los niveles de β catenina en el NAcc de animales que recibieron el pretratamiento con salina o LiCl y que fueron sacrificados 24 hs luego de la última inyección en el día 28. El análisis de ANOVA de tres vías aplicado a los datos de la figura reveló un efecto significativo tanto del pretratamiento [$F(1,44)=33,5$, $p<0,001$] como del desafío [$F(1,44)=6,301$ $p<0,016$]. El análisis *post hoc* de LSD mostró que tanto el grupo sensibilizado (Sal/Coc/Coc), como los grupos pretratados con LiCl (LiCl/Sal/Sal, LiCl/Sal/Coc, LiCl/Coc/Sal y LiCl/Coc/Coc) presentaron diferencias significativas con el grupo control (Sal/Sal/Sal).

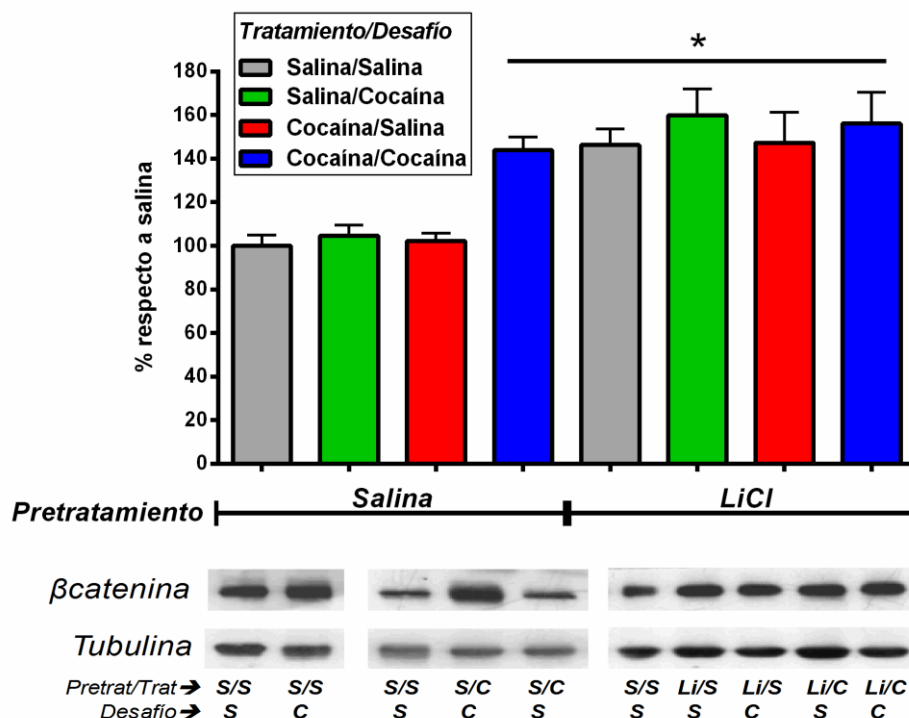
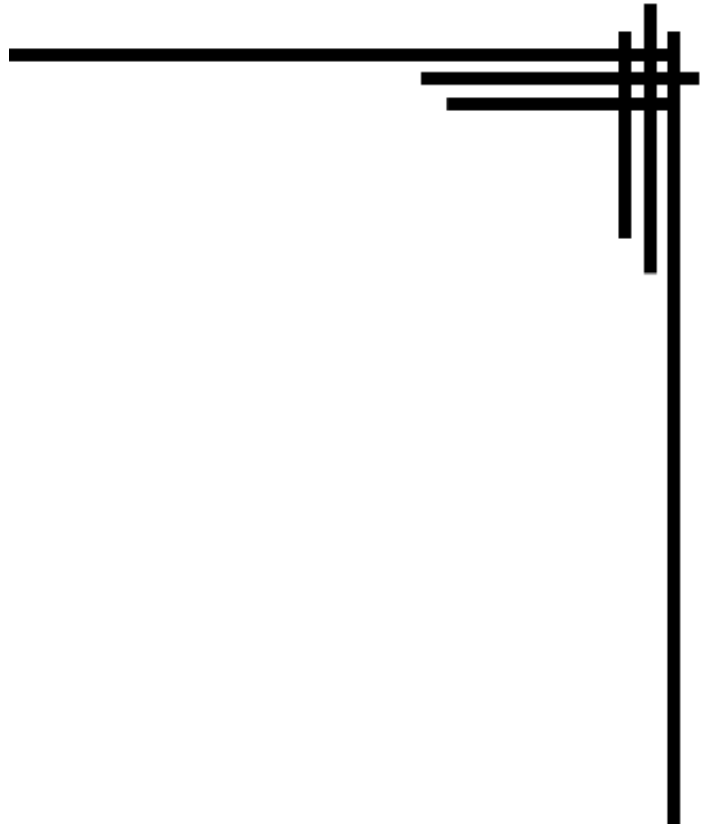


Figura 43: Niveles de β catenina en homogenados totales del NAcc de animales pretratados con LiCl o salina durante el desarrollo de sensibilización. El gráfico de barras muestra los niveles de β catenina en animales que recibieron salina o LiCl antes de salina o cocaína durante el desarrollo y posteriormente fueron desafiados con salina o cocaína en el día 28. Todos los grupos fueron sacrificados 24hs después de la última inyección. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de los porcentajes de variación en función del grupo Salina/Salina/Salina. *Significativamente diferente de Salina/Salina/Salina, $p < 0.01$. ANOVA de tres vía, post test LSD. ($n = 5-8$ por grupo).

Estos resultados indicarían que el pretratamiento con LiCl durante el desarrollo de la sensibilización tendría un efecto a largo plazo elevando los niveles de β catenina. Este aumento podría impedir el cambio que se observa durante la expresión de la sensibilización, sugiriendo que más que el nivel de actividad en sí, sería la modificación en la actividad de la vía el evento crucial que permitiría que tenga lugar la respuesta comportamental aumentada en presencia de la cocaína.



DISCUSIÓN

El objetivo general del presente trabajo de tesis consistió en determinar el posible rol de la vía canónica de Wnt y sus efectores en las neuroadaptaciones desencadenadas por la exposición a cocaína durante la sensibilización comportamental. Los principales hallazgos obtenidos fueron los siguientes: pudimos determinar que el desarrollo de la sensibilización está asociado con modificaciones a nivel del efector final de la vía canónica de Wnt, la β catenina, en áreas del circuito de la motivación tales como la CPF, el ED y la Amíg. Así, en la CPF encontramos una disminución en la actividad de la vía, la cual sería necesaria y suficiente para permitir el desarrollo de sensibilización; mientras que, en el ED la disminución en los niveles de β catenina sería necesaria, pero no suficiente. Además, demostramos que el bloqueo del desarrollo de sensibilización inducido por un pretratamiento con un activador sistémico de la vía (el LiCl), está asociado a un restablecimiento de los niveles de β catenina en todas las áreas estudiadas (CPF, Amig y ED) así como en la fracción nuclear de la CPF. Más aún, se determinó que este restablecimiento en los niveles de β catenina produciría modificaciones que tendrían efectos a largo plazo en la respuesta frente a un desafío con cocaína. En el caso de la expresión de la sensibilización, los resultados obtenidos también indicaron que existen modificaciones en la actividad de la vía que se relacionan directamente con las respuestas comportamentales. Por otro lado, se determinó que existe una relación directa entre la activación de la vía canónica en el NAcc y la expresión de la sensibilización, siendo ambos fenómenos dependientes del desafío con cocaína. Finalmente, se determinó que la modificación en la actividad de la vía en el ED también sería de gran importancia durante esta etapa de la sensibilización. Es así que en conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis postularían que la vía de señalización Wnt/ β catenina tiene una importante participación dentro de las neuroadaptaciones necesarias para el desarrollo y la expresión de sensibilización comportamental inducida por cocaína.

Por su parte, en los últimos años se ha observado que los factores de crecimiento Wnt, además de participar durante el desarrollo embrionario, se expresan persistentemente en el cerebro adulto en donde tendrían un rol activo en el mantenimiento y la protección de las conexiones neuronales durante toda la adultez. A su vez, se ha propuesto que ciertas enfermedades del SNC podrían estar relacionadas con estos factores [157]. Particularmente, se determinó que varios efectores de la vía canónica de Wnt se encuentran modificados en desórdenes como la esquizofrenia [7-10]. Además, se ha determinado que la exposición a distintas drogas que también

involucran efectos sobre las vías dopaminérgicas mesocorticolímbicas, producen modificaciones sobre distintas proteína implicadas en esta vía de señalización [165-167]. A pesar de esto, no se había postulado aún una relación directa entre las modificaciones en las vías dopaminérgicas generadas por la adicción a cocaína y la vía de señalización Wnt/ β catenina.

El abuso de drogas es un fenómeno crónico y duradero que tiene un alto impacto tanto en la salud, como en el entorno de los individuos adictos, llevando a la desintegración familiar, a la violencia doméstica, a la deserción escolar, a la desocupación, e incluso a la realización actos criminales [184]. A pesar de esto y de que los mecanismos neurales que subyacen a la adicción han sido extensamente investigados, son pocos los fármacos y/o tratamientos disponibles para hacer frente a la dependencia de drogas, remarcando la importancia de continuar con las investigaciones y los desarrollos en este área [11, 184].

Dentro de los modelos animales utilizados para el estudio del consumo repetido de drogas, la sensibilización comportamental sigue siendo un modelo relativamente simple y útil para estudiar los cambios plásticos relevantes para la adicción. Tal es así que las neuroadaptaciones que acompañan a la sensibilización motora se superponen con aquellas relacionados con el aumento en la motivación por la búsqueda de la droga [138]. Más aun, los circuitos neurales, así como los cambios neuroquímicos y moleculares que subyacen a la sensibilización son similares a aquellos observados en la recaída frente a los comportamientos de búsqueda de la droga [11].

A través del impacto sobre del circuito de la motivación, las drogas adictivas modifican el desarrollo de estrategias dirigidas hacia estímulos biológicos en favor de comportamientos que se orientan progresivamente a la búsqueda y el consumo de droga [70]. En el presente trabajo de tesis, se determinó que el desarrollo de sensibilización comportamental está asociado con una disminución en los niveles del efector final de la vía canónica, la β catenina, en homogenados totales de áreas pertenecientes a este circuito de la motivación como son la CPF, el ED y la Amíg. Además, acompañando a estos cambios, se observó un aumento en los niveles del la proteína GSK3 β activa respecto al grupo control. Más aún, encontramos que aquellos animales que no mostraron el aumento en la actividad locomotora frente al tratamiento repetido con cocaína (animales no sensibilizados) presentan niveles de β catenina semejantes a los observados en el grupo control en todas las áreas evaluadas, indicando que el desarrollo de sensibilización estaría asociado con una reducción en el efector final de la vía.

Asimismo, se determinó que 24 hs luego de una inyección aguda de cocaína no se observan modificaciones en los niveles de β catenina en ninguna de las áreas evaluadas, indicando que la disminución en los niveles estaría directamente relacionada con el desarrollo de sensibilización comportamental a cocaína.

Como fuera mencionado la CPF tiene una particular importancia durante esta etapa de la sensibilización. Diversos estudios demostraron que animales con lesiones en éste área no desarrollan la sensibilización a cocaína [90, 103, 104]; al mismo tiempo que se demostró que la estimulación eléctrica de la CPF es suficiente para inducirla [105]. En función de estos antecedentes se profundizó el estudio sobre las modificaciones de la vía canónica en éste área en particular. Los resultados mostraron que la reducción en la β catenina observada en los homogenados totales de los animales que desarrollaron la sensibilización comportamental, sería consecuencia de una disminución en los niveles nucleares del efector final de la vía. Más aún, el análisis de la expresión del ARNm de *Axina2*, un gen propuesto como indicador de la actividad de la vía canónica [162], y del ARNm del *Wnt7b* indicó una reducción en comparación con los animales controles. Estas evidencias postularían que el desarrollo de sensibilización a cocaína involucraría una reducción en la actividad de la vía canónica de Wnt en esta área en particular, aunque sin dejar de depender de cambios en los niveles de β catenina del ED y la Amíg.

Para profundizar en el análisis sobre la importancia de las modificaciones en los niveles de β catenina durante el desarrollo se trabajó con un activador de la vía canónica de Wnt como es el LiCl. Previamente Xu y col. [169] habían demostrado que el pretratamiento sistémico con éste fármaco (100mg/kg) en ratas produce un bloqueo en el desarrollo de la sensibilización. En el presente trabajo de tesis, encontramos que una dosis de 30mg/kg de LiCl es suficiente para bloquear el desarrollo de sensibilización. Más aun, demostramos que este efecto del LiCl está asociado no solo con un restablecimiento en los niveles de β catenina en los homogenados totales de todas aquellas áreas evaluadas, sino también con un restablecimiento de los niveles en la fracción nuclear de la CPF. Estos hallazgos confirmarían que la disminución en los niveles de β catenina es una modificación necesaria para el desarrollo de la sensibilización a cocaína.

Habiendo determinado que la disminución en los niveles de β catenina en áreas del circuito de la motivación es necesaria para el desarrollo de la sensibilización, se procedió establecer la importancia de este cambio en ciertas áreas del circuito. Concretamente se realizó una intervención farmacológica con un inhibidor de la vía

canónica del Wnt, el Sulindac, administrado directamente en la CPF o en el ED. Los resultados obtenidos mostraron que el pretratamiento con Sulindac en la CPF exacerba el desarrollo de la sensibilización comportamental a cocaína, mientras que en el ED no produce efecto. El análisis molecular mostró que los niveles de β catenina se encontraban significativamente disminuidos específicamente en las áreas donde el Sulindac fue infundido. Esto nos permite sugerir que las modificaciones en la CPF serían tanto necesarias como suficientes para el desarrollo de la sensibilización. En tanto que, los cambios en el ED serían necesarios es decir, que acompañarían al resto de las modificaciones observadas. Estudios futuros deberán realizarse para determinar la importancia para el desarrollo de sensibilización de los cambios observados en la Amíg.

En conjunto estos resultados postularían, por primera vez la participación de la vía canónica de Wnt en el desarrollo de la sensibilización. Dado que las evidencias existentes evaluaron los niveles de actividad de GSK3 β luego de la administración de cocaína pero no lo relacionaron con su función como efector de la vía canónica. Así, en la línea de nuestros resultados, Miller y col. (2009; 2014) demostraron que en ratones sacrificados 30 minutos luego de una inyección aguda de cocaína la actividad de la GSK3 β está aumentada en el ED [168, 185], lo que podría dar lugar a una disminución en los niveles de β catenina que no fue medida en dichos trabajos. En tanto que, la actividad en la CPF y en el NAcc no presentó modificaciones [185]. Por otro lado, un aumento en la actividad de la GSK3 β en el NAcc *core* fue observado por Kim y col. (2013) en ratas sacrificadas 60 minutos luego de una inyección aguda [171]; y, por Xu y col. (2009), en animales que desarrollaron sensibilización a cocaína y fueron sacrificados 24 hs luego [169]. El hecho de que nuestros resultados no mostraran modificaciones en el NAcc puede explicarse teniendo en cuenta que, en todos los casos, la disección realizada del NAcc incluyó tanto el *core* como el *shell*. Esta diferencia en la extracción del área podría ser responsable de que no haya sido detectado el efecto que el aumento en la actividad de la GSK3 β tendría sobre los niveles de β catenina. En líneas generales, estos trabajos previos muestran un aumento de actividad de GSK3 β sugiriendo una disminución en los niveles de β catenina. La originalidad de los resultados aquí presentados estaría en el establecimiento de una relación entre esos cambios, la actividad de la vía canónica de Wnt y las neuroadaptaciones necesarias para la inducción del desarrollo de sensibilización.

Si bien en este trabajo de tesis demostramos que la disminución en la actividad de la vía canónica sería una neuroadaptación indispensable para el desarrollo de

sensibilización, aun no estaría claro cuál sería el mecanismo molecular implicado. Evidencias previas involucrarían tanto a la transmisión dopaminérgica como a los D₂R. Específicamente, la administración crónica de anfetamina produce una disminución en los niveles de β catenina en el ATV, mientras que el tratamiento con antagonistas de los D₂R (drogas antipsicóticas) produce el efecto opuesto tanto en el ATV como en la CPF y el ED [165, 166]. Además, recientemente se ha demostrado que los D₂R interactúan con la β catenina mediante sus dominios intracelulares impidiendo que ingrese al núcleo y active la transcripción de sus genes blanco [186]. Más aún, se ha determinado que los antipsicóticos producen un aumento en los niveles de Dvl-3 que lleva a un incremento en los niveles de β catenina en el ATV y en la CPF [166, 167] y que este efecto estaría mediado por los autoreceptores D₂ [167, 187]. Coincidentemente, resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis revelaron que el Sulindac, un inhibidor de la vía canónica de Wnt que actúa a nivel de Dvl impidiendo su activación, administrado directamente en la CPF facilita el desarrollo de sensibilización, a la vez que produce una disminución en los niveles de β catenina.

Durante el desarrollo de la sensibilización la CPF juega un importante rol y una de las principales neuroadaptaciones asociadas a éste área es la disminución en la función de los receptores D₂ [110, 112, 113], que sería la responsable de la pérdida del control excitatorio de las proyecciones glutamatérgicas que van hacia el NAcc y el ATV [114]. Es posible que la pérdida de funcionalidad de los autoreceptores D₂ esté asociada con la disminución en la actividad de la vía canónica de Wnt que se produce por el tratamiento crónico con cocaína y podría originarse a nivel de Dvl o incluso corriente arriba. Avalando esta hipótesis, recientemente fue demostrado que Dvl es un importante regulador del acoplamiento de los receptores Fz con su correspondiente proteína G α_i . Puntualmente se observó que en células en cultivo, tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de Dvl-3 impacta fuertemente sobre la eficiencia de la señalización desencadenada por la activación de Fz6 y mediada por la proteína G α_i , postulando que en condiciones normales los niveles de Dvl están estrictamente regulados [188]. Teniendo en cuenta que esta regulación no está relacionada al dominio de unión a Fz [188], y que Dvl también interactúa con los D₂R [167], es posible que el desarrollo de sensibilización a cocaína produzca una modificación en los niveles de Dvl, y que este cambio sea el responsable de la menor funcionalidad observada en los D₂R.

Por otro lado, corriente arriba de Dvl, la actividad de la vía está regulada mediante los niveles extracelulares de los distintos factores Wnt y de diversas proteínas

que actúan como inhibidores fisiológicos. Sin bien nuestros resultados muestran una disminución en la expresión del ARNm de *Wnt7b* en la CPF de los animales que desarrollaron la sensibilización, apuntando a que modificaciones en la síntesis de los factores Wnt controlarían la actividad de la vía corriente arriba de Dvl; también existen evidencias que sugerirían un rol importante de Dickkopf-1 (un inhibidor fisiológico de la vía Wnt/ β catenina [189]). En relación a esto, ha sido demostrado que en ratones adultos la inducción en la expresión de Dickkopf-1 en el estriado provoca una disminución en la transmisión dopaminérgica mediada por los D₁R y los D₂R, sin modificaciones en los niveles totales de esta proteína [190]. Además, un estudio preliminar realizado en individuos con psicosis que consumen drogas adictivas encontró niveles de Dickkopf-1 en suero significativamente aumentados en comparación con pacientes con psicosis que no consumen drogas o con pacientes controles, postulando una relación entre el consumo de drogas y el incremento en los niveles de Dickkopf-1 [191]. En otras palabras, es posible que la disminución en la funcionalidad de los D₂R se genere por un cambio en los niveles de Dickkopf-1 provocado por el tratamiento con cocaína.

Si bien nuestros resultados en el ED indican modificaciones en los efectores de la vía canónica que coincidirían con observaciones previas [168, 185] la participación de la vía canónica de Wnt en esta área no es clara. A diferencia de lo observado en la CPF, la determinación de los niveles nucleares de β catenina en el ED no mostró diferencias al comparar los animales controles con aquellos que desarrollaron sensibilización, indicando que esta disminución podría no estar directamente relacionada con la actividad de la vía canónica de Wnt. Más aún, si bien el tratamiento intra-ED con Sulindac reduce los niveles totales de β catenina, esta disminución no es suficiente para provocar el desarrollo de sensibilización a cocaína. A pesar de esto, los niveles del efector final en aquellos animales que no desarrollaron la sensibilización fueron semejantes a los del grupo control, sugiriendo entonces que la disminución en los niveles de β catenina estaría relacionada con el desarrollo de la sensibilización, pero no sería suficiente para inducirla. El mecanismo implicado en estos cambios también podría involucrar a los D₂R, pero de una forma independiente de AMPc y de Dvl. Recientemente se ha observado que los receptores de DA pueden ejercer sus efectos a través de vías de señalización alternativas, como la que involucra a la proteína multifuncional β arrestina 2 [192, 193]. Esta proteína es generalmente reclutada hacia receptores asociados a proteína G que se encuentran activados/fosforilados y, además de participar en otras funciones, puede actuar como proteína de anclaje de otras quinasas y

fosfatasa formando un complejo que regula vías independientes de proteína G, como es la vía Akt/GSK3 [192, 193]. Se ha reportado que luego de la estimulación de los D₂R, se produce la inhibición de la proteína Akt, la consecuente activación de la GSK3 y a la modulación de los niveles de β catenina [171]. Es así que, teniendo en cuenta la alta densidad de expresión de los autorreceptores del tipo D₂ presentes particularmente en el ED [194], es probable que la disminución en los niveles de β catenina esté asociada a la activación de este mecanismo. Más aún, debido a que el desarrollo de sensibilización estaría acompañado por un incremento en la liberación de DA en el ED [85], esto podría explicar la mayor reducción que se observa en los niveles de β catenina luego del desarrollo de sensibilización en comparación con el tratamiento agudo e incluso podría estar relacionado, al menos en parte, con la observación de que en los animales no sensibilizados no presentan cambios a nivel del efector final en los homogenados totales. El análisis de los niveles de β catenina en las fracciones de membrana podría ayudar también a determinar el origen de la disminución en los niveles totales de este efector que se observa en los homogenados totales.

Respecto a las modificaciones observadas en la Amíg, al igual que para el caso del ED, la disminución en los niveles de β catenina parecería ser necesaria para el desarrollo de la sensibilización. Sin embargo, no es claro hasta el momento si estos cambios serían suficientes para desatar el fenómeno comportamental. Más aún, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el ED, los datos recabados en los distintos experimentos no serían suficientes para confirmar la participación de la vía canónica de Wnt en esta área durante el desarrollo de sensibilización. Dentro de las evidencias relevantes encontradas que involucran cambios en este área, podemos citar que en ratas sometidas a un esquema de condicionamiento por el sitio asociado con la droga o CPP (del inglés, conditioned place preference), la reactivación de la memoria de recompensa asociada a la cocaína está relacionada con un aumento en la actividad de la GSK3 β , y que la inhibición de la actividad de esta quinasa de forma sistémica (con LiCl) o área específica (con SB216763) impide la reconsolidación de este tipo de memorias [190]. Por consiguiente, es probable que las modificaciones observadas en los niveles de β catenina en la Amíg de animales sometidos al tratamiento repetido, además de acompañar al desarrollo de la sensibilización, tengan un rol relacionado a mecanismos involucrados en la memoria, procesos altamente ligados al fenómeno de la adicción [50].

En resumen, el desarrollo de la sensibilización estaría asociado con una disminución en los niveles de β catenina en áreas pertenecientes al circuito de la

motivación, y su restablecimiento llevaría al bloqueo del fenómeno comportamental. Dentro de las áreas estudiadas, encontramos que la disminución en la actividad de la vía canónica en la CPF tendría un rol fundamental dentro de las neuroadaptaciones que dan lugar al desarrollo de sensibilización y podría estar relacionada con las modificaciones que se producen en los D₂R durante esta etapa. La participación de estos receptores también influiría en los cambios observados en el ED, en donde encontramos que si bien la reducción en los niveles de β catenina estaría relacionada con la sensibilización, no sería de por sí suficiente para influir en la respuesta frente a un tratamiento crónico. Respecto a la Amíg, los resultados obtenidos no permiten afirmar con certeza una participación de la vía durante el desarrollo de la sensibilización, planteando la necesidad de continuar con los estudios para esclarecer si la vía canónica de Wnt se encuentra involucrada en esta área.

Todas estas modificaciones mencionadas darían lugar a los cambios que se producen a largo plazo en el sistema mesocorticolímbico luego de cesado el tratamiento y durante el período en que los animales permanecen sin contacto con la droga, y que dan lugar, frente a un nuevo desafío con la droga, a la expresión de la sensibilización [63].

Nuestros resultados mostraron que junto con la expresión de la sensibilización, los niveles de β catenina se encuentran disminuidos en los homogenados totales obtenidos a partir del ED y aumentados en los homogenados totales del NAcc, tanto en los animales sacrificados a 3 como a 24 hs luego de recibida la última inyección del tratamiento. En tanto que en la CPF no se encontraron diferencias significativas frente a ningún tratamiento ni período de sacrificio.

La expresión de la sensibilización ha mostrado depender de cambios en la función neuronal generados fundamentalmente en el NAcc, y el análisis de la actividad de la vía canónica parecería estar en consonancia con esta participación. Los análisis moleculares mostraron que aquellos animales que expresaron la sensibilización presentan junto al aumento en los niveles de β catenina, una disminución en la actividad de la quinasa GSK3 β . Más aún, a través de la evaluación de subfracciones celulares se pudo determinar que el cambio de β catenina se produce también a nivel nuclear, postulando que la expresión de la sensibilización se da asociada a un aumento en la actividad de la vía canónica de Wnt.

Como fuera mencionado en la introducción, los animales que desarrollan sensibilización muestran un cambio bidireccional en la plasticidad de los receptores

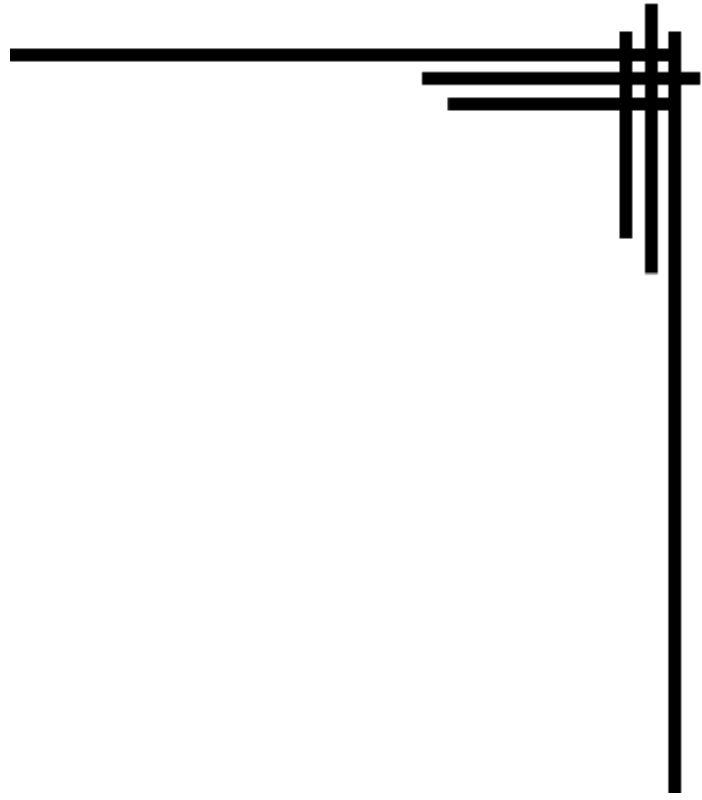
ionotrópicos de Glu del tipo AMPA en el NAcc. Luego de 3 semanas de abstinencia, la expresión en la superficie de este tipo de receptores se encuentra incrementada. El desafío con cocaína revierte este aumento superficial de los receptores AMPA, llevando a una disminución en las subunidades que componen este receptores 24 hs luego de la inyección, a su vez que se observa una disminución en la relación AMPA/NMDA. Estas modificaciones que se producen en el NAcc se darían solo en aquellos animales que expresaron la sensibilización y requerirían de la presencia de la cocaína [135, 136, 195]. De forma similar, nuestros resultados indican que el aumento en los niveles de β catenina en el NAcc está ligado tanto a la expresión de la sensibilización, como al desafío con la cocaína. Al mismo tiempo, recientemente Peng y col [196] mostraron que la sobreexpresión de una isoforma completa de la β catenina resistente a la degradación desencadenada por la GSK3 β en células postsinápticas de cultivos neuronales, lleva a una disminución en la densidad de los receptores AMPA presentes en la superficie sináptica y a un aumento en la relación NMDA/AMPA. Es decir, que en conjunto con estas evidencias, nuestros resultados permitirían postular que es el incremento en los niveles de β catenina que se produce en los animales que expresan la sensibilización el responsable de mediar los cambios plásticos en la neurotransmisión glutamatérgica que se producen durante esta etapa de la sensibilización. Respecto al mecanismo relacionado, es posible que los receptores del tipo D₁, y consecuentemente las NEMs del NAcc que expresan este tipo de receptores, estén involucrados. Se ha reportado que el tratamiento con agonistas de los D₁R produce la inhibición de la actividad de la GSK3 β tanto en células neuronales en cultivo, como en el hipocampo y la corteza de conejos tratados de forma sistémica [197, 198]. Teniendo en cuenta que luego de un período de abstinencia de un tratamiento repetido con cocaína los receptores D₁ del NAcc presentan una supersensibilidad [101, 128, 129] y que el desafío con la droga lleva a un aumento exacerbado en la liberación de DA en este área [120, 121], es posible que la activación de estos receptores provoque la acumulación de β catenina a través de la inhibición de la GSK3 β . Acompañando a estas modificaciones, influirían también cambios asociados con la neurotransmisión glutamatérgica. A este respecto, Sutton y Rushlow [199] demostraron que el tratamiento con agonistas de los receptores mGluR_{2/3} involucra la activación de la vía de Wnt, y a la estabilización de la β catenina [199] y, dado que, como fuera previamente mencionado, la expresión de la sensibilización estaría asociada a un incremento en la liberación de Glu producido por el

desafío con la droga [117], este mecanismo también podría estar participando del aumento en los niveles de β catenina.

Con respecto al ED, encontramos que el desafío con cocaína provoca una disminución en los niveles de β catenina respecto del grupo control en aquellos animales que expresan la sensibilización; en tanto que los animales que no la expresan, muestran niveles semejantes a los del grupo control. Por otro lado, la evaluación realizada luego de tres semanas sin contacto con la droga, mostró que los niveles del efector final de la vía se encuentran significativamente aumentados respecto de los controles. Si bien resultados preliminares, no mostrados en la presente tesis, indicarían que la actividad de la GSK3 β se encuentra aumentada como no fue realizada la evaluación de β catenina en la fracción nuclear, no podemos confirmar que los cambios hallados en éste área estén directamente relacionados con la actividad de la vía canónica de Wnt. No obstante esto, los resultados sugerirían que para que se produzca la expresión de la sensibilización la inyección de cocaína debe producir una disminución de la β catenina a niveles menores que aquellos observados en los animales controles y/o en los animales que no expresan la sensibilización. Con respecto a los mecanismos involucrados, al igual que durante el desarrollo de la sensibilización, la transmisión dopaminérgica y los receptores del tipo D₂ podrían mediar estos cambios. Se ha observado que tanto en adictos como en animales expuestos de forma repetida a la cocaína se produce una disminución de los D₂R que se mantiene por varios meses luego de finalizada la exposición [200]. Por tanto, teniendo en cuenta que la activación de los D₂R lleva a la degradación de la β catenina [171], la reducción en los niveles de estos receptores podría permitir que se produzca una mayor acumulación de β catenina en los animales que permanecieron sin contacto con la droga durante 21 días (grupo Coc/Sal) respecto del grupo control. Al mismo tiempo, la capacidad del desafío con cocaína de disminuir los niveles de β catenina por debajo del grupo control podrían estar relacionada con las modificaciones que se producen sobre este sistema y que llevan a los animales a expresar la sensibilización; cambios que estarían ausentes o no serían suficientes para mostrar el aumento en la actividad locomotora en los individuos no sensibilizados.

En conjunto, los resultados obtenidos durante la expresión de la sensibilización postularían que la vía canónica de Wnt participa también en esta etapa, mostrando modificaciones que se relacionan directamente con los cambios plásticos que se dan luego de la expresión de la sensibilización y en las áreas cerebrales previamente relacionadas con este período.

Como ya fuera mencionado, la expresión de la sensibilización dependería de las alteraciones neuronales duraderas que se originan en el desarrollo y luego de un período de abstinencia [63]. Es por ello que evaluamos si el bloqueo de la sensibilización logrado al restablecer de los niveles de β catenina mediante un tratamiento con un activador de la vía como es el LiCl, produce modificaciones a largo plazo en la respuesta frente a un desafío con cocaína. Comportamentalmente encontramos que los animales pretratados con LiCl durante el desarrollo muestran, frente al desafío con cocaína en el día 28, una respuesta comparable a una inyección aguda, postulando que la activación de la vía canónica tiene un efecto a largo plazo sobre la respuesta comportamental a cocaína. La evaluación de los niveles de β catenina en el NAcc de los animales sacrificados 24 hs luego de la última inyección reveló que en todos los grupos pretratados con LiCl (LiCl/Sal/Sal, LiCl/Sal/Coc, LiCl/Coc/Sal y LiCl/Coc/Coc) muestran niveles de β catenina comparable a los observados en animales que expresan la sensibilización (grupo Sal/Coc/Coc). Estos resultados permiten sugerir, por un lado, que la modificación mediante un tratamiento sistémico en la actividad de la vía canónica durante el desarrollo de sensibilización tiene un efecto tanto a corto como a largo plazo en las neuroadaptaciones generadas por el tratamiento con la cocaína, y por el otro, que los niveles de β catenina en sí mismos no mediarían la respuesta comportamental, sino que la expresión de la sensibilización se relacionaría con la capacidad del desafío con cocaína de producir un cambio en los niveles de este efector de la vía en el NAcc. En relación a esto ya ha sido demostrado que no serían los niveles absolutos de β catenina, sino la magnitud de cambio en esta proteína el que mediaría la respuesta y las modificaciones transcripcionales asociadas a la señalización de los factores Wnt [159, 201], indicando nuevamente la existencia de una relación entre la vía canónica de Wnt y la sensibilización comportamental a cocaína.

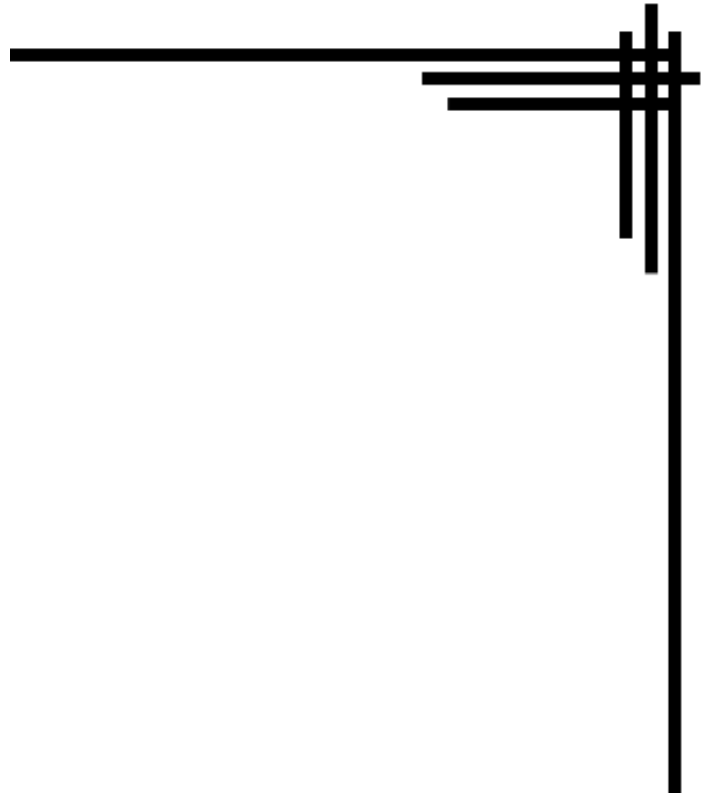


CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis indicarían un nuevo rol para la vía canónica de Wnt durante la sensibilización comportamental a cocaína permitiendo concluir que:

- el desarrollo de sensibilización está asociado con una disminución en los niveles de β catenina en distintas áreas del circuito de la motivación,
- que la inhibición de la vía canónica en la CPF es tanto necesaria como suficiente para permitir el desarrollo de la sensibilización,
- la expresión de la sensibilización está asociada a modificaciones a nivel de la β catenina en el NAcc y el ED,
- la activación de la vía canónica de Wnt en el NAcc está asociada con la expresión, y
- que la activación farmacológica de la vía canónica de Wnt, y el consecuente restablecimiento de los niveles de β catenina, durante el desarrollo de la sensibilización llevaría a cambios plásticos duraderos que impedirían que se den las modificaciones necesarias para que, frente a un nuevo contacto con la droga, se observe una respuesta comportamental aumentada.

La adicción a cocaína continúa siendo un problema que afecta a la sociedad en su totalidad, así como también lo es la falta de un tratamiento farmacológico o terapéutico efectivo. Es por esto que el conocimiento de los mecanismos responsables de las neuroadaptaciones a largo plazo producidos por las drogas y que dan lugar tanto a la adicción como a la alta tasa de reincidencia, continúa siendo de gran interés. Los resultados obtenidos en la presente tesis aportan las primeras evidencias concretas sobre la participación de la vía Wnt/ β catenina dentro de los cambios plásticos que se producen y dan lugar a la sensibilización comportamental a cocaína. Más aún, la intervención farmacológica de la actividad de la vía mostró efectos tanto en el corto como en el largo plazo sobre la respuesta a la cocaína, proponiendo a la vía canónica de Wnt como un posible blanco de acción para el desarrollo de nuevos tratamientos que permitan obtener mejores resultados frente al problema de la adicción.



REFERENCIAS

1. Kelley, A.E., *Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning*. Neurosci Biobehav Rev, 2004. **27**(8): p. 765-76.
2. Everitt, B.J. and T.W. Robbins, *Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion*. Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1481-9.
3. Thomas, M.J., P.W. Kalivas, and Y. Shaham, *Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(2): p. 327-42.
4. Kalivas, P.W. and C. O'Brien, *Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(1): p. 166-80.
5. Robinson, T.E. and B. Kolb, *Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse*. Neuropharmacology, 2004. **47 Suppl 1**: p. 33-46.
6. Ciani, L. and P.C. Salinas, *WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(5): p. 351-62.
7. Oliva, C.A., J.Y. Vargas, and N.C. Inestrosa, *Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 224.
8. Kozlovsky, N., R.H. Belmaker, and G. Agam, *GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia*. Eur Neuropsychopharmacol, 2002. **12**(1): p. 13-25.
9. Emamian, E.S., et al., *Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 131-7.
10. Katsu, T., et al., *The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia*. Neurosci Lett, 2003. **353**(1): p. 53-6.
11. Steketee, J.D. and P.W. Kalivas, *Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(2): p. 348-65.
12. Vizi, E.S. and A. Lajtha, *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. Neurotransmitter systems*. 3rd ed. Springer reference. 2008, New York: Springer. x, 465 p.
13. Marsden, C.A., *Dopamine: the rewarding years*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S136-44.
14. Zheng, G., L.P. Dwoskin, and P.A. Crooks, *Vesicular monoamine transporter 2: role as a novel target for drug development*. AAPS J, 2006. **8**(4): p. E682-92.
15. Nicholls, J.G. and J.G. Nicholls, *From neuron to brain*. 4th ed. 2001, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
16. Nestler, E.J., S.E. Hyman, and R.C. Malenka, *Molecular neuropharmacology : a foundation for clinical neuroscience*. 2nd ed. 2009, New York: McGraw-Hill Medical. xiv, 498 p.
17. Missale, C., et al., *Dopamine receptors: from structure to function*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 189-225.
18. Anzalone, A., et al., *Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors*. J Neurosci, 2012. **32**(26): p. 9023-34.
19. Stahl, S.M., *Essential psychopharmacology : neuroscientific basis and practical application*. 2nd ed. 2000, Cambridge, UK ; New York, NY, USA: Cambridge University Press. xii, 601 p.
20. Golan, D.E. and A.H. Tashjian, *Principles of pharmacology : the pathophysiologic basis of drug therapy*. 3rd ed. 2012, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xxi, 954 p.

21. Di Giovanni, G., V. Di Matteo, and E. Esposito, *Birth, life and death of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra*. Journal of neural transmission, 2009, Wien ; New York: Springer Verlag. xi, 369 p.
22. Arias-Carrion, O., et al., *Dopaminergic reward system: a short integrative review*. Int Arch Med, 2010. **3**: p. 24.
23. Volkow, N.D., et al., *Addiction circuitry in the human brain*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012. **52**: p. 321-36.
24. Russo, S.J. and E.J. Nestler, *The brain reward circuitry in mood disorders*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(9): p. 609-25.
25. Dunnett, S.B., *Dopamine*. 1st ed. Handbook of chemical neuroanatomy, 2005, Amsterdam ; Boston: Elsevier. xix, 588 p.
26. Tsai, T.-H., *Applications of microdialysis in pharmaceutical science*. 2011, Hoboken, N.J.: Wiley. xii, 571 p.
27. Kreitzer, A.C. and R.C. Malenka, *Striatal plasticity and basal ganglia circuit function*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 543-54.
28. Di Giovanni, G. and E. Esposito, *The basal ganglia pathophysiology : recent advances*, 2007. 2007, Trivandrum, Kerala, India: Transworld Research Network. 347 p.
29. DeLong, M.R. and T. Wichmann, *Circuits and circuit disorders of the basal ganglia*. Arch Neurol, 2007. **64**(1): p. 20-4.
30. Graybiel, A.M., *The basal ganglia*. Curr Biol, 2000. **10**(14): p. R509-11.
31. Conn, P.M., *Neuroscience in medicine*. 3rd ed. 2008, Totowa, N.J.: Humana Press. xiii, 816 p.
32. Keeler, J.F., D.O. Pretsell, and T.W. Robbins, *Functional implications of dopamine D1 vs. D2 receptors: A 'prepare and select' model of the striatal direct vs. indirect pathways*. Neuroscience, 2014. **282C**: p. 156-175.
33. Albin, R.L., A.B. Young, and J.B. Penny, *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. Trends in Neurosci., 1989. **12**: p. 366-375.
34. DeLong, M.R., *Primate models of movement disorders of basal ganglia origin*. Trends in Neurosci., 1990. **13**: p. 281-285.
35. Glickman, S.E. and B.B. Schiff, *A biological theory of reinforcement*. Psychol Rev, 1967. **74**(2): p. 81-109.
36. Gerber, G.J., J. Sing, and R.A. Wise, *Pimozide attenuates lever pressing for water in rats*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1981. **14**: p. 201-205.
37. Ettenberg, A. and J.C. Horvita, *Pimozide prevents the response reinstating effects of water reinforcement in rats*. Pharmacol. Biochem. Behav., 1990. **31**: p. 861-865.
38. Fouriez, G., P. Hansson, and R.A. Wise, *Neuroleptic-induced attenuation of brain stimulation reward*. J. Comp. Physiol. Psychol., 1978. **92**: p. 659-669.
39. Stellar, J.R., A.E. Kelley, and D. Corbett, *Effects of peripheral and central dopamine blockade on lateral hypothalamic self-stimulation: evidence for both reward and motor deficits*. Pharmacol.Biochem.Behav., 1983. **18**: p. 433-442.
40. Yokel, R.A. and R.A. Wise, *Attenuation of intravenous amphetamine reinforcement by central dopamine blockade in rats*. Psychopharmacology, 1976. **48**: p. 311-318.
41. de Wit, H. and R.A. Wise, *Blockade of cocaine reinforcement in rats with the dopamine receptor blocker pimozide, but not with the noradrenergic blockers phenolamine or phenoxybenzamine*. Can.J.Psychol., 1977. **31**: p. 195-203.
42. Bozarth, M.A. and R.A. Wise, *Heroin reward is dependent on a dopaminergic substrate*. Life Sci., 1981. **29**: p. 1881-1886.

43. Wise, R.A., *Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction*. Trends Neurosci, 2009. **32**(10): p. 517-24.
44. Robinson, S., et al., *Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards*. Behav Neurosci, 2005. **119**(1): p. 5-15.
45. Berridge, K. and T. Robinson, *What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?* Brain Research Reviews, 1998. **28**: p. 309-369.
46. Hyman, S.E., R.C. Malenka, and E.J. Nestler, *Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 565-98.
47. Schultz, W., *Behavioral theories and the neurophysiology of reward*. Annu Rev Psychol, 2006. **57**: p. 87-115.
48. Schultz, W., P. Dayan, and P.R. Montague, *A neural substrate of prediction and reward*. Science, 1997. **275**(5306): p. 1593-9.
49. Montague, P.R., S.E. Hyman, and J.D. Cohen, *Computational roles for dopamine in behavioural control*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 760-7.
50. Hyman, S.E., *Addiction: a disease of learning and memory*. Am J Psychiatry, 2005. **162**(8): p. 1414-22.
51. Berntson, G.G. and J.T. Cacioppo, *Handbook of neuroscience for the behavioral sciences*. 2009, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons.
52. Klüver, H. and P.C. Bucy, *Preliminary analysis of the functions of the temporal lobe in monkeys*. Arch. Neurol. Psych., 1939. **42**: p. 979-1000.
53. Weiskrantz, L., *Behavioral changes associated with the ablation of the amygdaloid complex in monkeys*. J. Comp. Physiol. Psychol., 1956. **49**: p. 381-391.
54. Jones, B. and M. Mishkin, *Limbic lesions and the problem of stimulus-reinforcement associations*. Exp. Neurol., 1972. **36**: p. 362-377.
55. Nauta, W.J.H., *Fiber degeneration following lesions of the amygdaloid complex in the monkey*. J. Anat., 1961. **95**: p. 515-531.
56. Herzog, A.G. and G.W. Van Hoesen, *Temporal neocortical afferent connections to the amygdala in the rhesus monkey*. Brain Res., 1976. **115**: p. 57-69.
57. Aggleton, J.P., M.J. Burton, and R.E. Passingham, *Cortical and subcortical afferents to the amygdala in the rhesus monkey (Macaca mulatta)*. Brain Res., 1980. **190**: p. 347-368.
58. Olds, J. and P. Milner, *Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain*. J.Comp.Physiol.Psychol., 1954. **47**: p. 419-427.
59. Corbett, D. and R.A. Wise, *Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable microelectrode study*. Brain Res., 1980. **185**: p. 1-15.
60. Fibiger, H.C. and A.G. Phillips, *Reward, motivation, cognition: psychobiology of mesotelencephalic dopamine systems*. Handbook of Physiology I, 1986. **4**: p. 647-675.
61. Kornetsky, C. and R.U. Esposito, *Euphoriogenic drugs: effects on reward pathways of the brain*. Fed. Proc., 1979. **38**: p. 2473.
62. Wise, R.A., *Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis*. Behav. Brain Sci., 1982. **5**: p. 39-88.
63. Pierce, R.C. and P.W. Kalivas, *A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants*. Brain Res Brain Res Rev, 1997. **25**(2): p. 192-216.

64. Weiner, I.B. and D.K. Freedheim, *Handbook of psychology*. 2003, Hoboken, N.J.: John Wiley.
65. Everitt, B.J. and T.W. Robbins, *From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013. **37**(9 Pt A): p. 1946-54.
66. Weiner, I.B., *Handbook of psychology*. 2nd ed. 2013, Hoboken, N.J.: Wiley. v. <1-8, 10-12 >.
67. Kelley, A.E., *Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms*. *Neuron*, 2004. **44**(1): p. 161-79.
68. Ross, S. and E. Peselow, *The neurobiology of addictive disorders*. *Clin Neuropharmacol*, 2009. **32**(5): p. 269-76.
69. Nestler, E.J., *Is there a common molecular pathway for addiction?* *Nat Neurosci*, 2005. **8**(11): p. 1445-9.
70. Kalivas, P.W. and N.D. Volkow, *The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice*. *Am J Psychiatry*, 2005. **162**(8): p. 1403-13.
71. Goldstein, R.A. and N.D. Volkow, *Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex*. *Am J Psychiatry*, 2002. **159**: p. 1642-1652.
72. Baker, D.A., et al., *Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(7): p. 743-9.
73. Moran, M.M., et al., *Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking*. *J Neurosci*, 2005. **25**(27): p. 6389-93.
74. Kalivas, P.W., *The glutamate homeostasis hypothesis of addiction*. *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(8): p. 561-72.
75. Toda, S., et al., *Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking*. *J Neurosci*, 2006. **26**(5): p. 1579-87.
76. Toda, S., H. Shen, and P.W. Kalivas, *Inhibition of actin polymerization prevents cocaine-induced changes in spine morphology in the nucleus accumbens*. *Neurotox Res*, 2010. **18**(3-4): p. 410-5.
77. Wagner, F.A. and J.C. Anthony, *From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol*. *Neuropsychopharmacology*, 2002. **26**(4): p. 479-88.
78. Glantz, M.D., et al., *Mental disorders as risk factors for later substance dependence: estimates of optimal prevention and treatment benefits*. *Psychol Med*, 2009. **39**(8): p. 1365-77.
79. Robinson, T.E. and K.C. Berridge, *Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008. **363**(1507): p. 3137-46.
80. Robinson, T.E. and K.C. Berridge, *Addiction*. *Annu Rev Psychol*, 2003. **54**: p. 25-53.
81. O'Brien, C.P. and E.L. Gardner, *Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models*. *Pharmacol Ther*, 2005. **108**(1): p. 18-58.
82. Hyman, S.E. and R.C. Malenka, *Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(10): p. 695-703.
83. Kalivas, P.W. and B. Weber, *Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988. **245**(3): p. 1095-102.

84. Cador, M., Y. Bijiou, and L. Stinus, *Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine*. Neuroscience, 1995.
85. Wolf, M.E., *The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants*. Progress in Neurobiology, 1998. **54**(6): p. 679-720.
86. Williams, J.M. and J.D. Steketee, *Time-dependent effects of repeated cocaine administration on dopamine transmission in the medial prefrontal cortex*. Neuropharmacology, 2005. **48**(1): p. 51-61.
87. Karler, R., et al., *Blockade of 'reverse tolerance' to cocaine and amphetamine by MK-801*. Life Sci., 1989. **45**: p. 599-606.
88. Kalivas, P.W. and J.E. Alesdatter, *Involvement of N-methyl-D-aspartate receptor stimulation in the ventral tegmental area and amygdala in behavioral sensitization to cocaine*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **267**(1): p. 486-95.
89. Wolf, M. and M. Jeziorski, *Coadministration of MK-801 with amphetamine, cocaine or morphine prevents rather than transiently masks the development of behavioral sensitization*. Brain Research, 1993. **613**: p. 291-294.
90. Li, Y., et al., *Both glutamate receptor antagonists and prefrontal cortex lesions prevent induction of cocaine sensitization and associated neuroadaptations*. Synapse, 1999. **34**(3): p. 169-80.
91. Morrow, B., J. Taylor, and R. Roth, *R-(+)-HA-966, an antagonist for the glycine/NMDA receptor, prevents locomotor sensitization to repeated cocaine exposures*. Brain Research, 1995. **673**: p. 165-169.
92. Karler, R., L.D. Calder, and J.B. Bedingfield, *Cocaine behavioral sensitization and the excitatory amino acids*. Psychopharmacology, 1994. **115**: p. 305-310.
93. Li, Y., et al., *Effects of the AMPA receptor antagonist NBQX on the development and expression of behavioral sensitization to cocaine and amphetamine*. Psychopharmacology (Berl), 1997. **134**(3): p. 266-76.
94. White, F.J. and R.Y. Wang, *Electrophysiological evidence for A10 dopamine autoreceptor sensitivity following chronic d-amphetamine treatment*. Brain Research, 1984. **309**: p. 283-292.
95. Henry, D.J., M.A. Greene, and F.J. White, *Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: repeated administration*. J.Pharmacol.Exp.Ther., 1989. **251**: p. 833-839.
96. Kalivas, P.W. and P. Duffy, *D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area*. J Neurosci, 1995. **15**(7 Pt 2): p. 5379-88.
97. Wolf, M.E. and C.-J. Xue, *Amphetamine and D1 dopamine receptor agonists produce biphasic effects on glutamate efflux in rat ventral tegmental area: Modification by repeated amphetamine administration*. J.Neurochem., 1998. **70**: p. 198-209.
98. Cornish, J.L. and P.W. Kalivas, *Repeated cocaine administration into the rat ventral tegmental area produces behavioral sensitization to a systemic cocaine challenge*. Behav Brain Res, 2001. **126**(1-2): p. 205-9.
99. Pierce, R.C., et al., *Repeated intra-ventral tegmental area administration of SKF-38393 induces behavioral and neurochemical sensitization to a subsequent cocaine challenge*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(1): p. 384-92.
100. Dunn, J.M., et al., *Repeated administration of AMPA or a metabotropic glutamate receptor agonist into the rat ventral tegmental area augments the subsequent behavioral hyperactivity induced by cocaine*. Psychopharmacology (Berl), 2005. **179**(1): p. 172-80.

101. Henry, D.J. and F.J. White, *Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D₁ dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens*. J.Pharmacol.Exp.Ther., 1991. **258**: p. 882-890.
102. De Vries, T., A. Cools, and T. Shippenberg, *Infusion of a D-1 receptor agonist into the nucleus accumbens enhances cocaine-induced behavioral sensitization*. NeuroReport, 1998. **9**: p. 1763-1768.
103. Tzschentke, T.M. and W.J. Schmidt, *The development of cocaine-induced behavioral sensitization is affected by discrete quinolinic acid lesions of the prelimbic medial prefrontal cortex*. Brain Research, 1998. **795**: p. 71-76.
104. Tzschentke, T.M. and W.J. Schmidt, *Differential effects of discrete subarea-specific lesions of the rat medial prefrontal cortex on amphetamine- and cocaine-induced behavioural sensitization*. Cereb Cortex, 2000. **10**(5): p. 488-98.
105. Schenk, S. and S. Snow, *Sensitization to cocaine's motor activating properties produced by electrical kindling of the medial prefrontal cortex but not of the hippocampus*. Brain Res., 1994. **659**: p. 17-22.
106. Sorg, B.A., et al., *Repeated daily cocaine alters subsequent cocaine-induced increase of extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **281**(1): p. 54-61.
107. Chefer, V., et al., *Kappa-opioid receptor activation prevents alterations in mesocortical dopamine neurotransmission that occur during abstinence from cocaine*. Neuroscience, 2000. **101**(3): p. 619-627.
108. Meiergerd, S.M., J.O. Schenk, and B.A. Sorg, *Repeated cocaine and stress increase dopamine clearance in the rat medial prefrontal cortex*. Br.Res., 1997. **773**: p. 203-207.
109. Beyer, C.E. and J.D. Steketee, *Dopamine depletion in the medial prefrontal cortex induces sensitized- like behavioral and neurochemical responses to cocaine*. Brain Res, 1999. **833**(2): p. 133-41.
110. Beyer, C.E. and J.D. Steketee, *Cocaine Sensitization: Modulation by Dopamine D2 Receptors*. Cerebral Cortex, 2002. **12**(5): p. 526-535.
111. Nasif, F.J., et al., *Repeated cocaine administration increases membrane excitability of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(3): p. 1305-13.
112. Beyer, C.E. and J.D. Steketee, *Intra-medial prefrontal cortex injection of quinpirole, but not SKF 38393, blocks the acute motor-stimulant response to cocaine in the rat*. Psychopharmacology (Berl), 2000. **151**(2-3): p. 211-8.
113. Steketee, J.D. and T.J. Walsh, *Repeated injections of sulpiride into the medial prefrontal cortex induces sensitization to cocaine in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2005. **179**(4): p. 753-60.
114. Liu, K. and J.D. Steketee, *Repeated exposure to cocaine alters medial prefrontal cortex dopamine D-like receptor modulation of glutamate and dopamine neurotransmission within the mesocorticolimbic system*. J Neurochem, 2011. **119**(2): p. 332-41.
115. Williams, J.M. and J.D. Steketee, *Cocaine increases medial prefrontal cortical glutamate overflow in cocaine-sensitized rats: a time course study*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(6): p. 1639-46.
116. Xie, X. and J.D. Steketee, *Effects of repeated exposure to cocaine on group II metabotropic glutamate receptor function in the rat medial prefrontal cortex: behavioral and neurochemical studies*. Psychopharmacology (Berl), 2009. **203**(3): p. 501-10.

117. Pierce, R.C., et al., *Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization*. J Neurosci, 1996. **16**(4): p. 1550-60.
118. Bowers, M.S., et al., *Activator of G Protein Signaling 3: A Gatekeeper of Cocaine Sensitization and Drug Seeking*. Neuron, 2004. **42**(2): p. 269-281.
119. Vanderschuren, L.J.M.J. and P.W. Kalivas, *Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies*. Psychopharmacology, 2000. **151**(2): p. 99-120.
120. Kalivas, P.W. and P. Duffy, *Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals*. J Neurosci, 1993. **13**(1): p. 266-75.
121. Williams, J.E.G., et al., *Parametric analysis of the effects of cocaine pretreatment on dopamine release in nucleus accumbens measured by fast cyclic voltammetry*. Brain Res., 1996. **678**: p. 225-232.
122. Martin-Iverson, M.T. and A.R. Reimer, *Effects of nimodipine and/or haloperidol on the expression of conditioned locomotion and sensitization to cocaine in rats*. Psychopharmacology, 1994. **114**: p. 315-320.
123. Pierce, R.C. and P.W. Kalivas, *Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine*. J Neurosci, 1997. **17**(9): p. 3254-61.
124. Kuhar, M. and N. Pilotte, *Neurochemical changes in cocaine withdrawal*. TiPS, 1996. **17**: p. 260-264.
125. Pierce, R.C. and P.W. Kalivas, *Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **275**(2): p. 1019-29.
126. Pierce, R.C., P. Duffy, and P.W. Kalivas, *Sensitization to cocaine and dopamine autoreceptor subsensitivity in the nucleus accumbens*. Synapse, 1995. **20**(1): p. 33-6.
127. King, G.R., et al., *Withdrawal from continuous or intermittent cocaine administration: changes in D₂ receptor function*. J.Pharmacol.Exp.Ther., 1994. **269**: p. 743-749.
128. White, F.J., et al., *Neurophysiological alterations in the mesocorticolimbic dopamine system during repeated cocaine administration*, in *The Neurobiology of Cocaine Addiction*, R. Hammer, Editor. 1995, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 99-120.
129. Unterwald, E.M., J. Fillmore, and M.J. Kreek, *Chronic repeated cocaine administration increases dopamine D1 receptor-mediated signal transduction*. Eur J Pharmacol, 1996. **318**(1): p. 31-5.
130. Ujike, H., K. Akiyama, and S. Otsuki, *D-2 but not D-1 dopamine agonists produce augmented behavioral response in rats after subchronic treatment with methamphetamine or cocaine*. Psychopharmacology, 1990. **102**: p. 459-464.
131. Bell, K. and P.W. Kalivas, *Context-specific cross-sensitization between systemic cocaine and intra-accumbens AMPA infusion in the rat*. Psychopharmacology, 1996. **127**(4): p. 377-383.
132. Ferrario, C.R., et al., *The role of glutamate receptor redistribution in locomotor sensitization to cocaine*. Neuropsychopharmacology, 2010. **35**(3): p. 818-33.
133. Schumann, J. and R. Yaka, *Prolonged withdrawal from repeated noncontingent cocaine exposure increases NMDA receptor expression and ERK activity in the nucleus accumbens*. J Neurosci, 2009. **29**(21): p. 6955-63.

134. Ghasemzadeh, M.B., P. Vasudevan, and C. Mueller, *Locomotor sensitization to cocaine is associated with distinct pattern of glutamate receptor trafficking to the postsynaptic density in prefrontal cortex: early versus late withdrawal effects*. Pharmacol Biochem Behav, 2009. **92**(3): p. 383-92.
135. Boudreau, A.C., et al., *Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases*. J Neurosci, 2007. **27**(39): p. 10621-35.
136. Boudreau, A.C. and M.E. Wolf, *Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens*. J Neurosci, 2005. **25**(40): p. 9144-51.
137. Boudreau, A.C., et al., *Signaling pathway adaptations and novel protein kinase A substrates related to behavioral sensitization to cocaine*. J Neurochem, 2009. **110**(1): p. 363-77.
138. Wolf, M.E. and C.R. Ferrario, *AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine*. Neurosci Biobehav Rev, 2010.
139. Bachtell, R.K. and D.W. Self, *Renewed cocaine exposure produces transient alterations in nucleus accumbens AMPA receptor-mediated behavior*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12808-14.
140. Pierce, R.C., et al., *Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine*. Neuroscience, 1998. **82**(4): p. 1103-14.
141. Timmer, K.M. and J.D. Steketee, *Group I metabotropic glutamate receptors in the medial prefrontal cortex: role in mesocorticolimbic glutamate release in cocaine sensitization*. Synapse, 2013. **67**(12): p. 887-96.
142. Robison, A.J. and E.J. Nestler, *Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(11): p. 623-37.
143. Robinson, T.E. and B. Kolb, *Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine*. J. Neurosci., 1997. **17**: p. 8491-8497.
144. Robinson, T.E., et al., *Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex*. Synapse, 2001. **39**(3): p. 257-66.
145. Robinson, T.E. and B. Kolb, *Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(5): p. 1598-604.
146. Munoz-Cuevas, F.J., et al., *Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference*. Nat Neurosci, 2013. **16**(10): p. 1367-9.
147. Ferrario, C.R., et al., *Neural and behavioral plasticity associated with the transition from controlled to escalated cocaine use*. Biol Psychiatry, 2005. **58**(9): p. 751-9.
148. Russo, S.J., et al., *Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3529-37.
149. Kim, J., et al., *Cell type-specific alterations in the nucleus accumbens by repeated exposures to cocaine*. Biol Psychiatry, 2011. **69**(11): p. 1026-34.
150. Dobi, A., et al., *Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal*. J Neurosci, 2011. **31**(5): p. 1895-904.

151. Lee, K.W., et al., *Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3399-404.
152. Lobo, M.K. and E.J. Nestler, *The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons*. Front Neuroanat, 2011. **5**: p. 41.
153. Russo, S.J., et al., *The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens*. Trends Neurosci, 2010. **33**(6): p. 267-76.
154. Nusse, R. and H. Varmus, *Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed*. EMBO J, 2012. **31**(12): p. 2670-84.
155. Willert, K., et al., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 448-52.
156. Mulligan, K.A. and B.N. Cheyette, *Wnt signaling in vertebrate neural development and function*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(4): p. 774-87.
157. Inestrosa, N.C. and E. Arenas, *Emerging roles of Wnts in the adult nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(2): p. 77-86.
158. Maguschak, K.A. and K.J. Ressler, *A role for WNT/beta-catenin signaling in the neural mechanisms of behavior*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(4): p. 763-73.
159. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
160. Aberle, H., et al., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. EMBO J, 1997. **16**(13): p. 3797-804.
161. Li, V.S., et al., *Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1245-56.
162. Lustig, B., et al., *Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(4): p. 1184-93.
163. Harris, T.J. and M. Peifer, *Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(5): p. 234-7.
164. Maguschak, K.A. and K.J. Ressler, *The dynamic role of beta-catenin in synaptic plasticity*. Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 78-88.
165. Alimohamad, H., et al., *Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum*. Biol Psychiatry, 2005. **57**(5): p. 533-42.
166. Alimohamad, H., et al., *The effects of antipsychotics on beta-catenin, glycogen synthase kinase-3 and dishevelled in the ventral midbrain of rats*. J Neurochem, 2005. **95**(2): p. 513-25.
167. Sutton, L.P., et al., *Activation of the canonical Wnt pathway by the antipsychotics haloperidol and clozapine involves dishevelled-3*. J Neurochem, 2007. **102**(1): p. 153-69.
168. Miller, J.S., R.J. Tallarida, and E.M. Unterwald, *Cocaine-induced hyperactivity and sensitization are dependent on GSK3*. Neuropharmacology, 2009. **56**(8): p. 1116-23.
169. Xu, C.M., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta in the nucleus accumbens core mediates cocaine-induced behavioral sensitization*. J Neurochem, 2009. **111**(6): p. 1357-68.
170. Perrine, S.A., J.S. Miller, and E.M. Unterwald, *Cocaine regulates protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 activity in selective regions of rat brain*. J Neurochem, 2008. **107**(2): p. 570-7.

171. Kim, W.Y., et al., *Decrease of GSK3 β phosphorylation in the rat nucleus accumbens core enhances cocaine-induced hyper-locomotor activity*. J Neurochem, 2013. **125**(5): p. 642-8.
172. Pacchioni, A.M., A. Gabriele, and R.E. See, *Dorsal striatum mediation of cocaine-seeking after withdrawal from short or long daily access cocaine self-administration in rats*. Behav Brain Res, 2010.
173. Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sixth ed. 2007, Amsterdam: Elsevier Academic Press.
174. Heffner, T.G., J.A. Hartman, and L.S. Seiden, *A rapid method for the regional dissection of the rat brain*. Pharmacol Biochem Behav, 1980. **13**(3): p. 453-6.
175. Kalivas, P.W. and P. Duffy, *Effects of daily cocaine and morphine treatment on somatodendritic and terminal field dopamine release*. J Neurochem, 1988. **50**(5): p. 1498-504.
176. Lee, H.J., et al., *Sulindac inhibits canonical Wnt signaling by blocking the PDZ domain of the protein Dishevelled*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(35): p. 6448-52.
177. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J.Biol.Chem., 1952. **193**: p. 265-275.
178. Toda, S., L.F. Alguacil, and P.W. Kalivas, *Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens*. J Neurochem, 2003. **87**(6): p. 1478-84.
179. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
180. Churchill, L., et al., *Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization*. J. Neurochem., 1999. **72**: p. 2397-2403.
181. Wang, Q.M., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation*. J Biol Chem, 1994. **269**(20): p. 14566-74.
182. Stambolic, V., L. Ruel, and J.R. Woodgett, *Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells*. Curr Biol, 1996. **6**(12): p. 1664-8.
183. Lim, J.C., et al., *Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells*. J Neurochem, 2008. **106**(4): p. 1855-65.
184. Kalivas, P.W. and N.D. Volkow, *New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity*. Mol Psychiatry, 2011.
185. Miller, J.S., et al., *The GSK3 signaling pathway is activated by cocaine and is critical for cocaine conditioned reward in mice*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88026.
186. Min, C., et al., *Novel regulatory mechanism of canonical Wnt signaling by dopamine D2 receptor through direct interaction with beta-catenin*. Mol Pharmacol, 2011. **80**(1): p. 68-78.
187. Sutton, L.P. and W.J. Rushlow, *The dopamine D2 receptor regulates Akt and GSK-3 via Dvl-3*. Int J Neuropsychopharmacol, 2012. **15**(7): p. 965-79.
188. Kilander, M.B., et al., *Dishevelled regulates precoupling of heterotrimeric G proteins to Frizzled 6*. FASEB J, 2014. **28**(5): p. 2293-305.
189. Bafico, A., et al., *Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(7): p. 683-6.

190. Wu, P., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta in the basolateral amygdala is critical for the reconsolidation of cocaine reward memory*. J Neurochem, 2011. **118**(1): p. 113-25.
191. Serata, D., et al., *Increased serum Dickkopf-1 levels in drug-abusing psychotic patients*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012. **36**(2): p. 239-44.
192. Beaulieu, J.M., et al., *An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior*. Cell, 2005. **122**(2): p. 261-73.
193. Beaulieu, J.M., et al., *Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5099-104.
194. Levey, A.I., et al., *Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993. **90**: p. 8861-8865.
195. Thomas, M.J., et al., *Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine*. Nat Neurosci, 2001. **4**(12): p. 1217-23.
196. Peng, Y.R., et al., *Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development*. Neuron, 2009. **61**(1): p. 71-84.
197. Gil, M., X. Zhen, and E. Friedman, *Prenatal cocaine exposure alters glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) pathway in select rabbit brain areas*. Neurosci Lett, 2003. **349**(3): p. 143-6.
198. Yu, Y., et al., *Neuroprotective effects of atypical D1 receptor agonist SKF83959 are mediated via D1 receptor-dependent inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta and a receptor-independent anti-oxidative action*. J Neurochem, 2008. **104**(4): p. 946-56.
199. Sutton, L.P. and W.J. Rushlow, *Regulation of Akt and Wnt signaling by the group II metabotropic glutamate receptor antagonist LY341495 and agonist LY379268*. J Neurochem, 2011. **117**(6): p. 973-83.
200. Volkow, N.D. and R.D. Baler, *Addiction science: Uncovering neurobiological complexity*. Neuropharmacology, 2014. **76 Pt B**: p. 235-49.
201. Goentoro, L. and M.W. Kirschner, *Evidence that fold-change, and not absolute level, of beta-catenin dictates Wnt signaling*. Mol Cell, 2009. **36**(5): p. 872-84.